

Université de Montréal

**Étude des mécanismes de répression transcriptionnelle
du gène de la proopiomélanocortine par les glucocorticoïdes:
Implication de Nur77/NGFI-B, un récepteur nucléaire orphelin**

Par
Christine Martens

Programme de Biochimie
Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
En vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M. Sc.)
En Biochimie

Novembre 2001

© Christine Martens



W

4

U58

2002

v.059

2002

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

**Étude des mécanismes de répression transcriptionnelle
du gène de la proopiomélanocortine par les glucocorticoïdes:
Implication de Nur77/NGFI-B, un récepteur nucléaire orphelin**

Présenté par:
Christine Martens

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr. Sylvie Mader

Dr. Jacques Drouin

Dr. Muriel Aubry

Mémoire Accepté le:

RÉSUMÉ

Le récepteur nucléaire orphelin NGFI-B s'est démarqué des autres récepteurs nucléaires par sa capacité à lier l'ADN sous la forme de monomère. L'importance de ce facteur de transcription a été mise en évidence par son rôle dans l'apoptose des cellules T et par son implication à tous les niveaux de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (axe HHS). Le stress induit une cascade neuroendocrinienne qui débute, au niveau de l'hypothalamus, par la sécrétion de CRH qui induit l'expression de NGFI-B dans les cellules corticotrophes de l'hypophyse, et NGFI-B à son tour induit la transcription du gène de la proopiomélanocortine (POMC) en liant un élément de réponse aux facteurs Nur, le NurRE. Cet élément de réponse a la particularité de lier des dimères de Nur77. La POMC est le précurseur de l'ACTH qui est le stimulus majeur de la synthèse des glucocorticoïdes. Les glucocorticoïdes activent ou répriment la transcription de différents gènes importants pour le métabolisme en liant un récepteur nucléaire (GR). Une surexpression de glucocorticoïdes peut avoir des conséquences néfastes sur l'organisme. Aussi régulent-ils leur propre synthèse en exerçant une rétro-inhibition de l'axe HHS en inhibant l'expression et la sécrétion du CRH et de la POMC/ACTH.

Les glucocorticoïdes inhibent la transcription de la POMC induite par le CRH en agissant au niveau du NurRE en antagonisant l'activité transcriptionnelle de NGFI-B. Le but de cette étude consistait à déterminer les mécanismes qui sont sous-jacents à l'antagonisme transcriptionnel entre NGFI-B et GR. Nous avons émis l'hypothèse qu'une interaction protéine/protéine directe ou indirecte (séquestration d'un cofacteur commun aux deux récepteurs nucléaires) entre NGFI-B et GR est impliquée dans la répression de la transcription de la POMC. Afin de vérifier cette hypothèse nous avons utilisé des techniques qui permettent d'étudier la nature des interactions entre deux protéines.

Ainsi, nous avons démontré une interaction directe entre NGFI-B et GR via leurs domaines de liaison à l'ADN. Cette interaction s'applique aux autres membres de la famille Nur. Nous avons également démontré que GR interagit avec NGFI-B sous la forme de monomère. En parallèle, nous avons observé que l'activité transcriptionnelle de NGFI-B est stimulée par des coactivateurs de la famille SRC et par CBP. Nous avons observé que les dimères ont une capacité plus grande à recruter les coactivateurs que les monomères.

Certains résultats expérimentaux suggèrent que l'antagonisme transcriptionnel entre NGFI-B et GR puisse s'appliquer à la régulation de la transcription du gène codant pour le CRH. De plus, il a été démontré que dans les cellules T, les glucocorticoïdes bloquent l'apoptose induite par l'activation du TCR en antagonisant l'activité transcriptionnelle de NGFI-B. Ceci reflète l'importance de l'identification de ce nouveau mécanisme d'action des glucocorticoïdes. De plus, ce mécanisme est similaire à celui qui avait été démontré dans le contrôle de l'expression des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire et/ou immunitaire où GR antagonise l'activité transcriptionnelle de NF- κ B et AP-1.

Mots clés : Glande pituitaire, Transcription, antagonisme transcriptionnel, Nur77/NGFI-B, GR, Glucocorticoïdes, Coactivateurs.

Une dispense a été accordée par le directeur du programme permettant ainsi de ne pas inclure le résumé en anglais.

TABLES DES MATIÈRES

Résumé.....	iii
Tables des matières	v
Liste des tables	vii
Liste des figures	viii
Liste des abréviations.....	ix
Remerciements	xii
1. Introduction	14
1.1. AXE HYPOTHALAMO-HYPOPHYSSO-SURRENALIEN.....	14
1.1.1. Description de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien	14
1.1.2. Le Syndrome de Cushing	15
1.1.3. Régulation de l'expression de la POMC par différents facteurs de transcription	17
1.2. MÉCANISME DE TRANSCRIPTION DE BASE	19
1.2.1. Assemblage du complexe de pré-initiation.....	19
1.2.2. Phosphorylation du domaine C-terminal de l'ARN polymérase II	21
1.2.3. Intégration des mécanismes d'initiation de la transcription et des mécanismes régulés par les facteurs de transcription	22
1.3. RÉCEPTEURS NUCLÉAIRES.....	23
1.3.1. Fonction des récepteurs nucléaires	23
1.3.2. Structure des récepteurs nucléaires.....	23
1.3.3. Classification des récepteurs nucléaires	24
1.3.4. Facteurs régulant l'activité transcriptionnelle des récepteurs nucléaires	25
1.3.4.1. Les corépresseurs	25
1.3.4.2. Les coactivateurs.....	26
1.3.4.2.1. Le cointégrateur CBP/p300	26
1.3.4.2.2. Les membres de la famille p160.....	26
1.3.5. Implication des récepteurs nucléaires dans la transcription du gène de la POMC	28
1.3.5.1. Nur77/NGFI-B.....	28
1.3.5.2. Homologie entre les membres de la famille Nur.....	28
1.3.5.3. Patron d'expression des facteurs Nur	29
1.3.5.4. Implications des facteurs Nur dans différentes voies de signalisation	30
1.3.5.4.1. Les facteurs Nur jouent un rôle important dans l'apoptose dans les cellules T.....	30
1.3.5.4.2. Les facteurs Nur modulent la voie de signalisation médiée par l'acide rétinoïque	31
1.3.5.4.3. Les facteurs Nur sont impliqués aux trois niveaux de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien.....	33
1.3.5.4.3.1. Les facteurs Nur au niveau de l'hypothalamus	33
1.3.5.4.3.2. Les facteurs Nur au niveau de l'hypophyse	33
1.3.5.4.3.3. Les facteurs Nur au niveau des surrénales.....	34
1.3.5.5. Analyse fonctionnelle de Nur77/NGFI-B	36
1.3.5.5.1. Domaine de transactivation de Nur77/NGFI-B.....	36
1.3.5.5.2. La phosphorylation de Nur77/NGFI-B joue un rôle important pour la régulation de son activité transcriptionnelle	37
1.3.5.5.3. Différence et/ou ressemblance des fonctions entre les facteurs Nur.....	38
1.3.5.6. Le récepteur des glucocorticoïdes	39
1.3.5.6.1. Le rôle des glucocorticoïdes	39

1.3.5.6.2. Mécanismes d'action des récepteurs aux glucocorticoïdes.....	40
1.3.5.6.2.1. Répression de l'activité AP-1 par GR	41
1.3.5.6.2.2. Répression de l'activité NF- κ B par GR	42
1.3.5.6.3. Les Glucocorticoïdes participent dans la différenciation des cellules T	45
1.3.5.6.4. Les glucocorticoïdes répriment l'axe Hypothalamo-hypophyso-surrénalien	46
1.3.5.6.4.1. Répression de la transcription de la POMC par les glucocorticoïdes	46
1.3.5.6.4.2. Répression de la transcription du CRH par les glucocorticoïdes.....	47
1.4. DESCRIPTION DU PROJET	49
2. Article 1.....	50
2.1. ABSTRACT.....	51
2.2. INTRODUCTION	52
2.3. MATERIALS AND METHOD.....	54
2.3.1. Plasmids.....	54
2.3.2. Cell culture and transfection	54
2.3.3. Recombinant protein production and pull-down assays	54
2.3.4. AtT-20 nuclear extracts and coimmunoprecipitation.....	55
2.3.5. Protein overexpression and electrophoretic mobility shift assays.....	55
2.4. RESULTS	56
2.4.1. Direct protein-protein interaction between Nur factors and GR	56
2.4.2. Nur factors domains required for GR antagonism and interaction	58
2.4.3. Interaction between NGFI-B/Nur77 and GR <i>in vivo</i>	62
2.4.4. NGFI-B/GR transcriptional antagonism is independent of GR homodimerization interface.....	63
2.4.5. NGFI-B/GR transcriptional antagonism is independent of GR residue K461	64
2.5. DISCUSSION	65
2.6. ACKNOWLEDGEMENTS	68
2.7. REFERENCES	69
3. Article 2.....	75
3.1. ABSTRACT.....	76
3.2. INTRODUCTION	76
3.3. MATERIAL AND METHODS.....	78
3.3.1. Plasmids.....	78
3.3.2. Cell culture and transfection.	78
3.3.3. Protein overexpression and electrophoretic mobility shift assays.....	79
3.4. RESULTS	79
3.4.1. NurRE- (but not NBRE-) dependent transcription is enhanced by SRC-1.	79
3.4.2. Synergism between Nur factors, SRC-1 and CBP.	81
3.4.3. NGFI-B and Nurr1 N-terminal domain is a target for p160 coactivators.....	81
3.5. DISCUSSION	84
3.6. ACKNOWLEDGEMENTS	87
3.7. REFERENCE.....	88
4. Discussion	93
4.1. Conclusions	93
4.2. Perspectives	95
Bibliographie	99

LISTE DES TABLES

Table 1.1..... p. 17

Table 1.2..... p. 48

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1.....	p. 16
Figure 1.2.....	p. 18
Figure 1.3.....	p. 20
Figure 1.4.....	p. 23
Figure 1.5.....	p. 25
Figure 1.6.....	p. 29
Figure 1.7.....	p. 35
Figure 1.8.....	p. 37
Figure 1.9.....	p. 42
Figure 1.10.....	p. 44
Figure 2.1.....	p. 57
Figure 2.2.....	p. 59
Figure 2.3.....	p. 60
Figure 2.4.....	p. 61
Figure 2.5.....	p. 62
Figure 2.6.....	p. 63
Figure 2.7.....	p. 64
Figure 3.1.....	p. 80
Figure 3.2.....	p. 80
Figure 3.3.....	p. 81
Figure 3.4.....	p. 82
Figure 3.5.....	p. 83

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A :	Adénine
ACTH :	« Adrenocorticotropin hormone »
ADN :	Acide désoxyribonucléique
AF-1 :	« Activation function 1 »
AF-2 :	« Activation function 2 »
α -GSU :	« alpha-Glycoprotein subunit »
AIB-1 :	« amplified in breast cancer-1 »
α -MSH :	« alpha-melanocyte stimulating hormone »
AP-1 :	« activator protein 1 »
AR :	« Androgene Receptor »
ARN pol :	ARN polymérase
ARN :	Acide ribonucléique
ARNm :	ARN messenger
AVP :	Vasopressine
Axe HHS :	Axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien
BHLH :	« basic helix-loop-helix »
C :	Cytosine
CBP :	« CREB-binding protein »
COUP-TF :	« Chicken ovalbumun upstream transcription factor »
CRE :	« cAMP response element »
CREB :	« Cyclic AMP response element »
CRH :	corticotropin releasing hormone
CTD :	« Carboxy-terminal domain »
DBD :	« DNA binding domain »
Dex :	« Dexamethazone »
Egr :	« early growth response »
ER :	« Estrogen Receptor »
ERK-2 :	« extracellular signal-regulated kinase-2 »
FGF :	« Fibroblast growth factor »
FTG :	Facteurs de transcription généraux
G :	Guanine

Gc :	Glucocorticoïdes
GILZ :	« Gc-induced leucine zipper »
GR :	« Glucocorticoid Receptor »
GRE :	« Glucocorticoid Response Element »
GRIP-1 :	« glucocorticoid receptor interacting protein-1 »
HAT :	« Histone acétyl transférase »
HD :	« Histone deacetylase »
HDAC :	« Histone deacetylase »
HNF-4 :	« Hepatocyte nuclear factor-4 »
ICAM-1 :	« intercellular adhesion molecule-1 »
IL :	interleukine
JNK :	« jun amino-terminal kinase »
LBD :	« Ligand binding domain »
LXR α :	« liver X receptor »
MAPK :	« Mitogen activated protein kinase »
MSin3 :	« mammalian Sin3 protein »
NBRE :	« NGFI-B response element »
NCoA :	« nuclear receptor coactivator »
Ncor :	« nuclear receptor corepressor »
NF- κ B :	« nuclear factor kappaB »
NF-AT :	« nuclear factor of activated T cells »
NGFI-B :	Nerve growth factor inducible-B
nGRE :	« Negative Glucocorticoid Response Element »
NOR-1 :	« Neuron derived orphan receptor-1 »
Nurr1 :	« Nur-related factor 1 »
NurRE :	« Nur Response Element »
Ohase :	Hydoxylase
pCIP :	« CBP interacting protein »
Pitx :	« Pituitary transcription factor homeobox »
PKA :	« Protein kinase A »
POMC :	Proopiomélanocortine
PPAR γ :	« Peroxisome proliferator activated factor gamma »
PR :	« Progesterone Receptor »
RAR :	« Retinoic acid receptor »

RARE :	« Retinoic acid response element »
RN :	« Récepteur nucléaire »
RXR :	« Retinoic X receptor »
SF-1 :	« steroidogenic factor 1 »
SMRT :	« Silencing mediator of retinoid and thyroid receptor »
SNF :	« sucrose non-fermenting »
SRB :	« Supressor of RNA pol II proteins »
SRC :	« steroid receptor coactivator »
SWI :	« switch »
T :	Thymidine
TAF :	« TBP-associated factors »
$\tau 1$:	« transactivation domain 1 »
TBP :	« TATA- box binding protein »
TCR :	« T-cell receptor »
TF :	« Transcription factor »
Tif :	« transcriptional intermediary factor »
TNF-1 :	« Tumor necrosis factor-1 »
T-Pit :	« T-box pituitary factor »
TR :	« Thyroid hormone Receptor »
TRAM :	« Thyroid receptor activator molecule »
VDR :	« Vitamin D receptor »

REMERCIEMENTS

Pour débiter, je voudrais remercier Jacques Drouin, mon superviseur, qui m'a donné la chance d'évoluer dans un milieu scientifique aussi stimulant et pour tous les bons conseils qu'il m'a donnés.

Ensuite, je tiens à remercier tous mes collègues ainsi que le Dr Mona Nemer et les membres de son équipe. Vous m'avez apporté beaucoup de support au cours de ces dernières années. Vos conseils et vos critiques m'ont aidé à évoluer autant d'un point de vue scientifique que personnel.

Il y a quelques personnes que je tiens à remercier en particulier. Je remercie Gino Poulin pour son humour, sa franchise et pour avoir enduré mon caractère un peu changeant et tous mes caprices durant ces deux années. Le terme «Gino» n'aura plus jamais le même sens pour moi. Ta passion pour la science a été pour moi une source d'inspiration. Je n'oublierai jamais ma copine française, Frédérique Souazé, qui a été ma complice dans ce laboratoire. Ensemble, nous étions un calvaire pour certains de nos collègues. Je remercie Mario Maïra qui m'a fait rire plus souvent qu'à son tour et qui m'a appris que dans la vie, quoi qu'il arrive, il faut avoir du «style». Merci à Lynda Robitaille pour sa gentillesse et sa bonne humeur, nos petits cafés vont me manquer énormément. Merci à Anne-Marie Pulichino, ta force de caractère et nos petites discussions entre les bureaux vont me manquer énormément. Merci à Maria Nudi, l'énergie et la bonne humeur que tu dégages embellissent les journées de tout le monde. Tu seras toujours ma petite princesse préférée. Merci à Gwendal Lemartelot qui a le don de mettre du piquant dans une journée. Merci à Alexandre Marcil, le respect et l'importance que tu accordes aux personnes que tu côtoies font chaud au cœur. Merci à Bruno Delorme, tes balles de tennis vont bientôt se retrouver sur le toit d'une école. Merci à Goerges Nemer qui a toujours pris le temps de m'écouter et qui m'a souvent encouragé. Merci à Lise Laroche, tu as toujours été à l'écoute. Je tiens à remercier Hélène Fournier, qui a m'a accordé une confiance aveugle. Tu es une amie inestimable, et je t'adore.

Je remercie mes parents et mon frère pour l'amour et l'encouragement qu'ils me portent depuis toujours. Finalement je remercie Steves mon compagnon de tous les jours, tu es toujours là pour moi dans les beaux jours comme dans les mauvais, merci pour ton amour et ta présence qui remplissent mon cœur de bonheur.

*À mes parents,
qui ont toujours été un modèle pour moi*

1.INTRODUCTION

1.1.AXE HYPOTHALAMO-HYPOPHYSO-SURRÉNALIEN

1.1.1.DESCRPTION DE L'AXE HYPOTHALAMO-HYPOPHYSO-SURRÉNALIEN

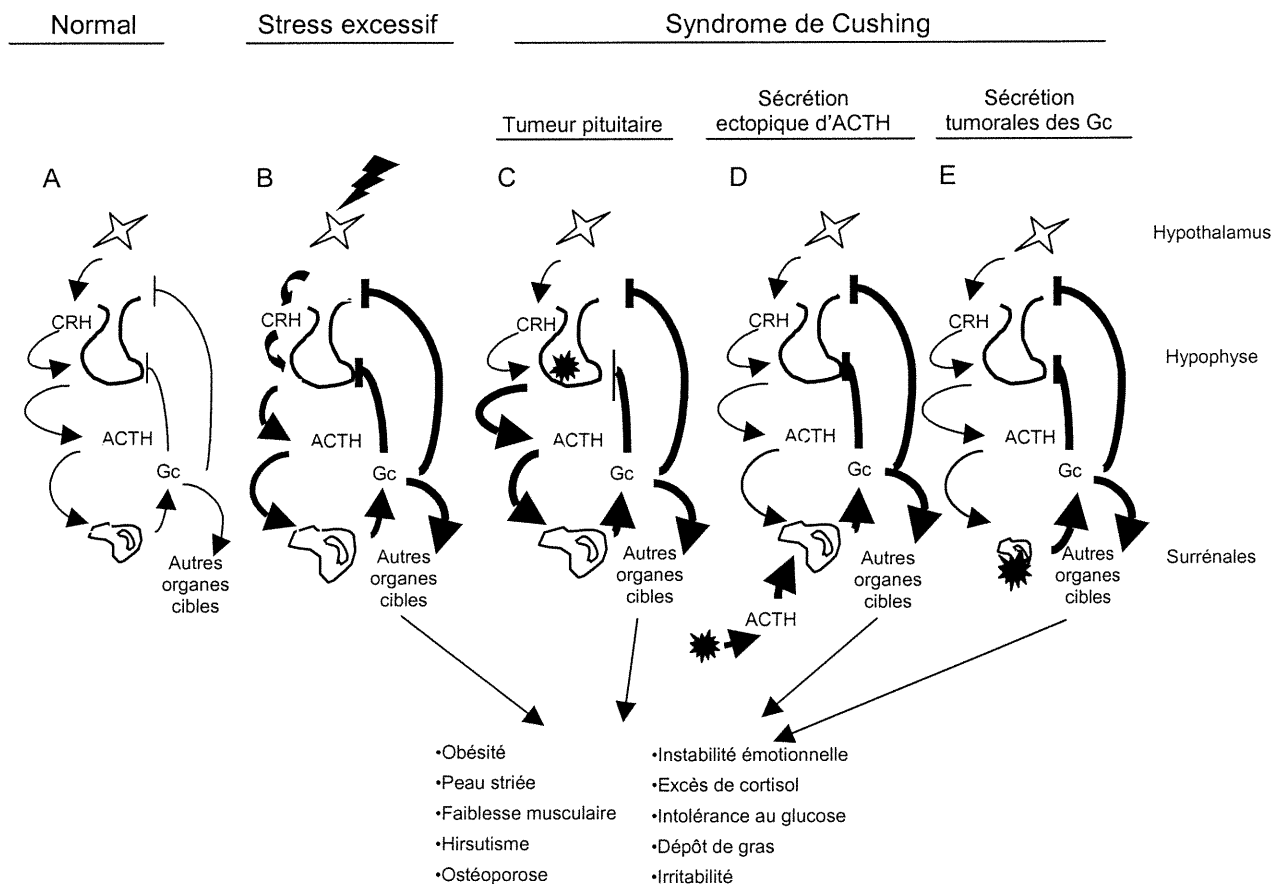
L'organisme doit s'adapter à différents stress physiques ou psychologiques et aux agressions de l'environnement. Une réponse adéquate au stress est régulée par une cascade neuroendocrinienne impliquant différentes glandes, soit l'hypothalamus, l'hypophyse et les glandes surrénales. Cette voie de réponse au stress, plus communément appelée l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (axe HHS) joue un rôle central dans le maintien de l'homéostasie de l'organisme en régulant le métabolisme intermédiaire suite à ces agressions. La perception d'un agent stressueur au niveau du système nerveux central stimule au niveau de l'éminence médiane du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus, la production de l'hormone de relâche de la corticotropine (CRH) et de la vasopressine (AVP) qui seront sécrétées dans la circulation porte hypophysaire. Au niveau de l'hypophyse, le CRH est reconnu par des récepteurs membranaires sur les cellules corticotrophes et induit la transcription de la proopiomélanocortine (POMC) et la sécrétion de l'hormone surrénalocorticotropine (ACTH). La POMC est un pro-peptide qui est le précurseur de différents peptides métaboliques actifs tels que des hormones et des endorphines. Parmi ces hormones on retrouve l'ACTH qui est produit au niveau du lobe antérieur de l'hypophyse et la mélanotropine (α -MSH) qui est produite au niveau du lobe neuro-intermédiaire de l'hypophyse. L'ACTH est le stimulus majeur de la synthèse des glucocorticoïdes (Gc) au niveau des glandes surrénales. Les Gc sont des hormones stéroïdiennes qui exercent leur action en liant un récepteur nucléaire spécifique aux Gc (GR, Glucocorticoids Receptor). En plus d'exercer plusieurs rôles au niveau du métabolisme des carbohydrates, dans l'induction de l'activité de différentes enzymes impliquées dans la gluconéogénèse, dans la stimulation de l'hématopoïèse, dans le contrôle du tonus musculaire et dans le contrôle de la réponse inflammatoire et de la réponse immunitaire, les Gc exercent une rétro-inhibition de leur propre synthèse en inhibant l'axe HHS au niveau de l'expression et de la sécrétion du CRH et de la POMC/ACTH (Fig. 1.1A) (Grossman, 1995). Une réponse au stress est cruciale pour que l'organisme puisse interagir avec son environnement. Toutefois, cette réponse doit être régulée de façon très serrée car si la réponse ne se termine pas de façon adéquate, une production excessive de Gc peut causer des dommages importants à l'organisme. Ce phénomène est observé chez des personnes atteintes du syndrome de stress chronique. Une

surproduction de Gc entraîne la suppression du système immunitaire et résulte en une prédisposition aux infections virales. Ainsi d'autres mécanismes sont mis en place pour inhiber l'activité de l'axe HHS. L'expression et la sécrétion du CRH, de l'AVP et de l'ACTH est régulée par différents peptides et neurotransmetteurs (revue dans (Jessop, 1999)). Toutefois, la nature ainsi que la pertinence biologique des mécanismes d'action de ces peptides ne sont pas très clairs. Dans certains cas, les études sont divergentes, alors que dans d'autres cas, l'effet répresseur *in vitro* n'est pas retrouvé *in vivo*.

Une des caractéristiques du système endocrinien consiste en une très grande organisation temporelle. La pression sanguine, la température corporelle et le niveau des hormones plasmatiques varient sur une période de 24 heures. Dans des conditions normales, les fonctions physiologiques sont régulées par une horloge interne qui est synchronisée par le cycle éveil/sommeil (Lewy et al., 1987) et les activités sociales (Honma et al., 1995). Le cycle circadien, du latin *circa diem* qui veut dire au cours d'une journée, permet d'organiser le milieu interne afin de coordonner les processus physiologiques (Van Cauter and Turek, 1995). Par exemple, la température du corps augmente juste avant qu'un animal se réveille en prévision de l'augmentation de l'activité métabolique qui sera requise pour la journée. Le cycle circadien est observé chez les procaryotes, chez les plantes et dans le règne animal. Les processus moléculaires qui décrivent la génétique des rythmes circadiens font le sujet de recherches intensives (King and Takahashi, 2000). Le cycle circadien de l'axe cortico-surrénalien est caractérisé par un niveau d'ACTH qui varie énormément au cours d'une journée. L'ACTH plasmatique commence à augmenter dans la période de sommeil la plus tardive pour atteindre un sommet au début de la matinée. Par la suite, les niveaux d'ACTH plasmatique diminuent pour atteindre un minimum tard en soirée. Le niveau de Gc varie en parallèle avec le niveau d'ACTH. Ce profil hormonal est affecté chez les personnes atteintes de maladies du foie, d'hypercortico-stérolémie, d'anorexie, chez les alcooliques en sevrage ainsi que chez certains patients atteints du syndrome de Cushing. Ainsi, les variations de ce profil hormonal permettent de détecter certaines maladies (Van Cauter and Turek, 1995).

1.1.2.LE SYNDROME DE CUSHING

Le syndrome du Cushing est l'exemple d'une manifestation clinique occasionnée par un dérèglement de l'axe HHS. C'est un syndrome qui est caractérisé par des symptômes qui reflètent une exposition excessive des tissus aux glucocorticoïdes. Les personnes atteintes de cette maladie souffrent d'obésité, de faiblesse musculaire,



Adapté de L. Nieman, *Endocrinology* 1995

Figure 1.1 Le syndrome de Cushing. Différents dérèglements de l'axe hypothalamo-hypophyséo-surrénalien entraînent l'apparition des symptômes observés chez les patients atteints du syndrome de Cushing. A) Suppression normale de l'axe HHS par les Gc. Suite à un stress, il y a relâche de CRH au niveau de l'hypothalamus. Le CRH induit la synthèse de la POMC qui est le précurseur de l'ACTH au niveau du lobe antérieur de l'hypophyse. L'ACTH stimule la synthèse des Glucocorticoïdes (Gc) au niveau des surrénales et les Gc inhibent l'axe HHS en bloquant la synthèse et la sécrétion de la CRH et de la POMC/ACTH. B) Le pseudo syndrome de Cushing se manifeste suite à un stress excessif résultant en une relâche accrue de CRH, une augmentation de la synthèse d'ACTH et des Gc ainsi que d'une hypertrophie des surrénales. C) Syndrome de Cushing causé par une tumeur pituitaire résultant en une synthèse excessive d'ACTH et de Gc. Caractérisé par une mauvaise répression de la transcription de la POMC par les Gc au niveau de l'hypophyse. D) Sécrétion ectopique d'ACTH. Des tumeurs présentes dans d'autres organes synthétisent de l'ACTH ce qui résulte en une synthèse accrue de Gc et en une hypertrophie des surrénales. E) Sécrétion tumorales des Gc. Une tumeur des glandes surrénales cause l'atrophie du cortex surrénalien ainsi que la sécrétion constitutive de Gc.

d'ostéoporose, d'intolérance au glucose, d'irritabilité et de dépression. Les dépôts de gras se font à des endroits inhabituels au niveau de la figure, du cou, de la région dorso-cervicale et de la cavité péritonéale. Un amincissement de la peau, des stries violacées sur la peau ainsi que de l'hirsutisme sont des manifestations souvent observées chez les personnes atteintes de cette maladie. Ce syndrome peut être causé par différents problèmes au niveau de l'axe HHS (Nieman and Cutler Jr, 1995). Une condition de stress excessif entraîne une augmentation de la sécrétion du CRH, une production excessive d'ACTH, une hypertrophie des surrénales et une augmentation de la quantité de corticostéroïde produite (Fig. 1.1B). C'est le pseudo syndrome de Cushing. Le syndrome de Cushing dépendant de la glande pituitaire est causé par des adénomes des cellules corticotrophes qui libèrent de l'ACTH de façon constitutive (Fig. 1.1C). Les Gc ne peuvent réprimer la sécrétion de l'ACTH au niveau de l'hypophyse. Ce dérèglement peut également être causé par une sécrétion ectopique d'ACTH à partir de tumeurs présentes dans d'autres tissus (Fig. 1.1D). L'origine de ces tumeurs est décrite dans la table 1.1. Enfin, la présence de tumeurs habituellement bénignes au niveau des surrénales cause une atrophie du cortex surrénalien et une expression constitutive de corticostéroïdes (Fig. 1.1E).

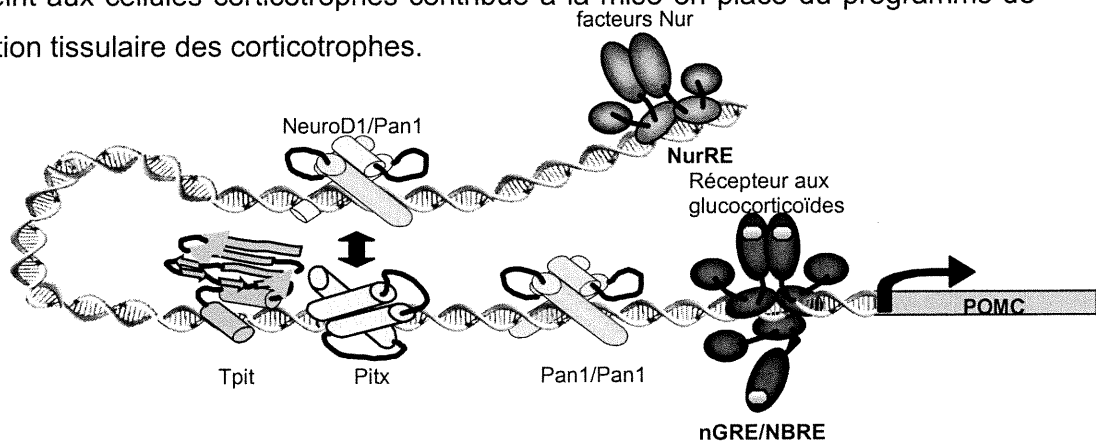
Origine des tumeurs	Incidence (%)
Carcinome au niveau des poumons	19-50
Carcinome au niveau des bronches	2-37
Carcinome au niveau du thymus	8-12
Tumeur du pancréas	4-12

Table 1.1 Origine des tumeurs sécrétant de l'ACTH

1.1.3. RÉGULATION DE L'EXPRESSION DE LA POMC PAR DIFFÉRENTS FACTEURS DE TRANSCRIPTION

La régulation de l'expression du CRH et de la POMC joue un rôle clé dans le maintien de l'homéostasie contrôlée par l'axe HHS. Plusieurs mécanismes de régulation de la transcription de la POMC dans les cellules corticotrophes ont été identifiés dans notre laboratoire. Ainsi, nous avons identifié différents facteurs de transcription qui activent ou qui répriment la transcription de la POMC. Ces facteurs sont très variés et certains d'entre eux ont été identifiés comme étant des facteurs essentiels pour la spécification tissulaire de la POMC. C'est le cas de Tpit qui est un facteur de transcription à boîte T qui partage une très grande homologie avec Brachyury (86%) (Lamolet et al., 2000). L'expression de ce facteur est restreinte uniquement aux

cellules exprimant de la POMC, soit les cellules mélanotrophes et les cellules corticotrophes. Tpit coopère avec Pitx1, une protéine à homéodomaine apparentée à bicoïde (Lamonerie et al., 1996) afin d'induire la transcription de la POMC. Tpit et Pitx1 lient des sites contigus sur le promoteur de la POMC (fig. 1.2) et la présence de ces deux sites est essentielle pour l'expression de la POMC (Lamolet et al., 2000). Pitx1 et son homologue Pitx2 sont exprimés dans tous les types cellulaires de l'hypophyse au cours de son développement et leur expression est maintenue dans le tissu adulte (Gage and Camper, 1997; Lanctôt et al., 1997; Lanctôt et al., 1999a; Lanctôt et al., 1999b). La mise au point de souris transgéniques avec un transgène codant pour Tpit sous le contrôle du promoteur de l' α -GSU (α -glycoprotein subunit) a permis d'activer la transcription de la POMC dans des structures transitoires de l'hypophyse qui n'expriment normalement pas la POMC. Ces structures expriment le facteur de transcription Pitx1. Ainsi, Tpit en présence de Pitx1 semble être suffisant pour initier l'expression tissulaire de la POMC dans ces structures, mais ils ne sont pas suffisant pour induire la différenciation de ces cellules en cellules corticotrophes puisqu'elles expriment toujours l' α -GSU alors que les cellules corticotrophes n'expriment pas l' α -GSU (Lamolet et al., 2001). Ainsi, la présence d'un autre facteur de transcription semble être requise pour exercer cette tâche. Le facteur de transcription bHLH (basic helix-loop-helix) NeuroD1 est exprimé dans les cellules endocrines du pancréas (Naya et al., 1995) et dans différents neurones (Lee et al., 1995a). Au niveau de l'hypophyse, NeuroD1 est exprimé dans les cellules corticotrophes où il active la transcription de la POMC en formant des hétérodimères avec le facteur bHLH ubiquitaire Pan1 et en synergisant avec Pitx1 via une interaction entre Pitx1 et Pan1 (Fig.1.2) (Poulin et al., 1997; Poulin et al., 2000). L'intégration de ce complexe de facteurs de transcription qui est restreint aux cellules corticotrophes contribue à la mise en place du programme de spécification tissulaire des corticotrophes.



Adapté de G. Poulin, MCB 2000

Figure 1.2 Facteurs de transcription régulant l'expression de la POMC.

Chez l'adulte, la pro-hormone POMC est essentielle pour le maintien de l'homéostasie. Son expression est modulée par différents signaux hormonaux. Le CRH induit l'expression rapide de la POMC et ce, du moins en partie, via l'induction de l'expression d'un récepteur nucléaire orphelin, NGFI-B/Nur77 (Philips et al., 1997a; Murphy and Conneely, 1997). Deux cibles pour ce récepteur nucléaire orphelin ont été identifiées dans le promoteur de la POMC, le NBRE qui lie les facteurs Nur sous la forme de monomère et le NurRE qui lie les facteurs Nur sous la forme de dimère (fig. 1.2) (Philips et al., 1997a). La réponse transcriptionnelle induite par le CRH est rapidement diminuée par les glucocorticoïdes. De plus l'action des glucocorticoïdes sur la transcription de la POMC converge sur les deux sites d'action des facteurs Nur (Drouin et al., 1993; Philips et al., 1997b; Murphy and Conneely, 1997). Le sujet de cette étude porte sur les mécanismes sous-jacents à la répression de la transcription de la POMC par les Gc et son récepteur lorsque l'axe HHS est activé par le CRH/Nur77. Il est important de bien décrire ces deux facteurs de transcription et leur mode d'action afin de déterminer la nature des mécanismes impliqués dans le contrôle de la transcription de la POMC par les glucocorticoïdes et le CRH.

1.2.MÉCANISME DE TRANSCRIPTION DE BASE

1.2.1.ASSEMBLAGE DU COMPLEXE DE PRÉ-INITIATION

L'initiation de la synthèse des ARN messagers (ARNm) est un mécanisme de contrôle essentiel dans la régulation de l'expression des gènes. Les cellules eucaryotes contiennent des milliers de gènes et la transcription de ces derniers est assurée par l'ARN polymérase II (ARN pol II). L'ARN pol II doit localiser le promoteur de façon efficace afin d'initier la transcription et l'élongation du message. Pour ce faire, l'ARN pol II nécessite la contribution de différentes protéines appelées facteurs de transcription généraux (FTG). Ces facteurs sont très conservés entre les différents organismes. L'efficacité de transcription de chaque gène est contrôlée par des protéines activatrices qui lient des séquences d'ADN promotrices localisées en amont du site d'initiation. Ces séquences sont appelées des "enhancers".

Les FTG sont formés d'une trentaine de polypeptides. Parmi ceux-ci on retrouve TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF et TFIIH. Chacun joue un rôle précis dans l'initiation de la transcription. De façon générale, le modèle d'initiation de la transcription, dérivé d'expérience *in vitro*, implique un mécanisme d'assemblage séquentiel du complexe de pré-initiation qui débute par la reconnaissance d'un élément de réponse localisé entre 25

A Arrangement séquentiel

B Holoenzyme

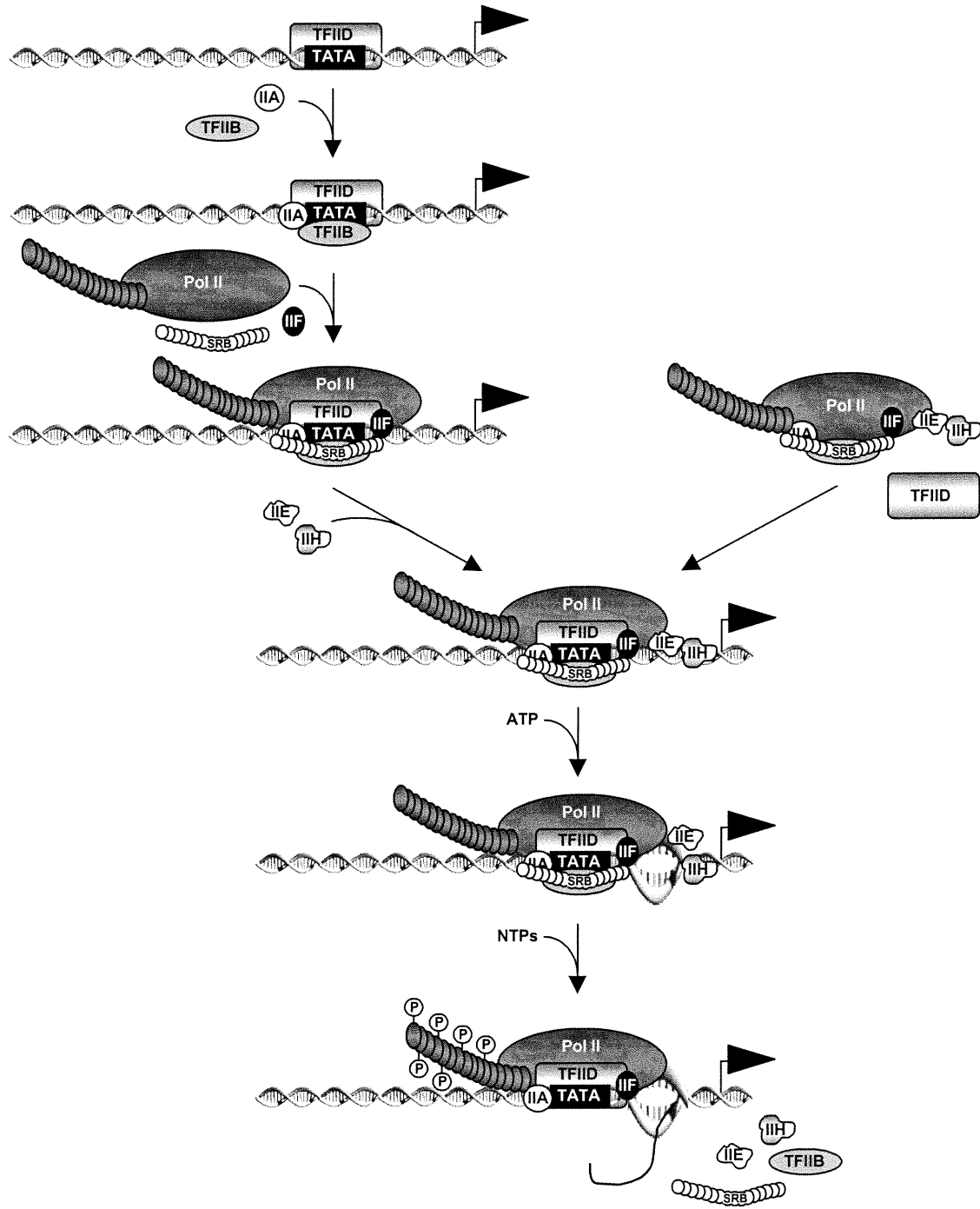


Figure 1.3 Mécanismes d'assemblage du complexe de pré-initiation de la transcription.

et 30 pb en amont du site d'initiation de la transcription par TFIID. Cet élément est caractérisé par une séquence riche en adénine-thymidine. C'est la boîte TATA TFIID est un complexe multiprotéique qui contient TBP (TATA-binding protein) et les TAFs (TBP-associated factors). La liaison de TBP à la boîte TATA entraîne une distorsion importante dans la courbure de l'ADN. Par la suite TFIIB et TFIIA reconnaissent TFIID. TFIIA sert essentiellement à stabiliser le complexe de pré-initiation, alors que TFIIB permet de recruter l'ARN pol II et TFIIIF au niveau de la boîte TATA. TFIIIF est un facteur qui induit l'élongation du messager. Enfin, TFIIIE et TFIIH lient le complexe de pré-initiation. TFIIIE va promouvoir le "melting" de l'ADN permettant la formation d'un complexe d'ADN ouvert. L'initiation de la transcription requiert la séparation des brins d'ADN pour permettre l'accès de l'ARN pol II aux nucléotides de la matrice et permettre la formation du premier lien phosphodiester du transcrit d'ARNm. TFIIH quant à lui est impliqué dans la phosphorylation du domaine C-terminal (CTD, C-terminal domain) de l'ARN pol II (Lu et al., 1992). L'extension du messager et la phosphorylation du CTD de l'ARN pol II perturbent le complexe de pré-initiation (Steinmetz, 1997). C'est ce qu'on appelle la "clearance" du promoteur (Fig. 1.3A). Récemment, un autre mécanisme d'assemblage du complexe de pré-initiation a été identifié. Ce mécanisme met en jeu une holoenzyme pol II formée de l'ARN pol II, TFIIIF, TFIIB, TFIIH et les protéines SRB (Suppressor of RNA pol II proteins) (fig. 1.3B) (Maldonado et al., 1996; Chao et al., 1996). Les protéines SRB sont une composante importante de l'holoenzyme et ils agissent comme activateur de la transcription (Hengartner et al., 1995; Chao et al., 1996; Koleske and Young, 1994). En effet, les protéines SRB forment un complexe multiprotéique entre l'holoenzyme et différentes protéines comme SWI/SNF dans le but de déstabiliser les nucléosomes rendant du même coup l'ADN accessible aux FTGs (Fig. 1.4) (Wilson et al., 1996; Halle and Meisterernst, 1996). L'holoenzyme est très stable en absence d'ADN et est capable d'initier la transcription lorsque mise en présence de TBP et TFIIIE (Koleske and Young, 1994). Ainsi, il semblerait que l'holoenzyme soit recrutée au promoteur où TFIID serait déjà lié.

1.2.2. PHOSPHORYLATION DU DOMAINE C-TERMINAL DE L'ARN POLYMERASE II

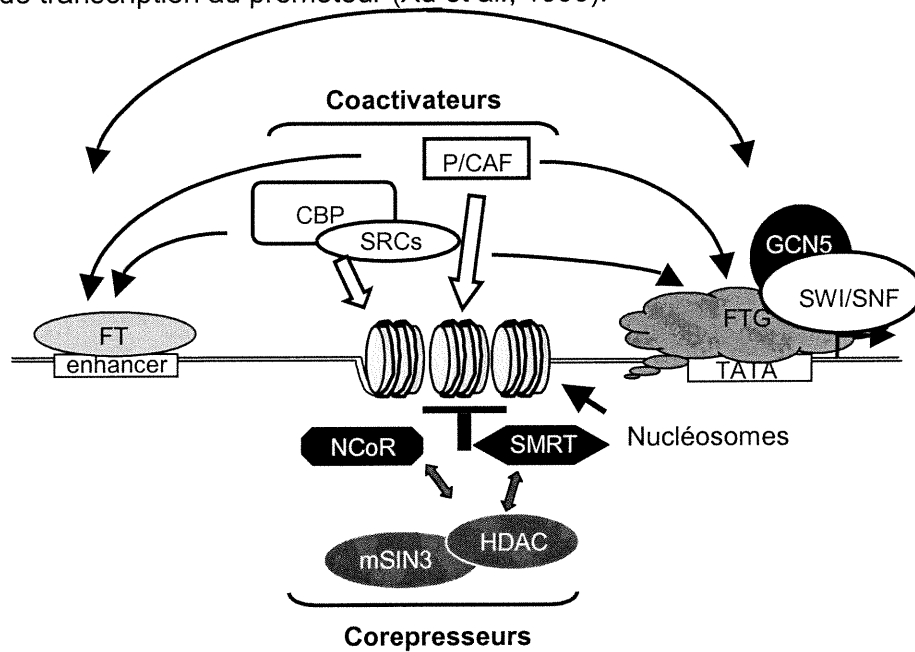
Les protéines SRB interagissent avec le CTD de l'ARN pol II. Cette structure essentielle conservée entre les espèces consiste en une répétition d'heptade dont la séquence est YSPTSPS. Il peut y avoir jusqu'à 52 répétitions de cette heptade. L'ARN pol II existe sous deux formes : l'ARN pol IIa (forme hypophosphorylée) et l'ARN pol IIo (forme hyperphosphorylée). La forme hypophosphorylée interagit avec les SRB et

garde l'ARN pol II dans un état latent. La conversion de l'ARN pol IIa en ARN pol IIo coïncide avec le changement de rôle de l'ARN pol II (Koleske and Young, 1995; Steinmetz, 1997). En effet, après phosphorylation du CTD, l'ARN pol II est activée et est en mesure de procéder à l'élongation du message. L'élongation de la synthèse de l'ARNm est contrôlée par deux classes de facteurs d'élongation : Les facteurs généraux d'élongation qui régulent la transcription efficace de tous les gènes codant pour une protéine et les facteurs régulateurs de l'élongation qui contrôlent l'expression de gènes spécifiques (Revue dans (Reines et al., 1996)).

1.2.3. INTÉGRATION DES MÉCANISMES D'INITIATION DE LA TRANSCRIPTION ET DES MÉCANISMES RÉGULÉS PAR LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION

En plus de l'ARN pol II, des FTGs et des autres protéines déstabilisant les nucléosomes, d'autres facteurs de transcription sont requis pour recruter et/ou stabiliser le complexe multiprotéique de transcription de base. Ces facteurs de transcription agissent en liant des éléments «enhancers» localisés dans les régions plus éloignées du promoteur des gènes codant pour des protéines (Koleske and Young, 1995; Koleske et al., 1992). Ces facteurs de transcription peuvent interagir directement avec les FTGs pour réguler la transcription d'un gène ou indirectement via des interactions avec des coactivateurs (Fig. 1.4) (Koleske and Young, 1994; Hengartner et al., 1995). Ces coactivateurs sont présents en quantité limitante dans la cellule et ils sont capables d'interagir avec la machinerie transcriptionnelle de base. Parmi ces coactivateurs, on retrouve CBP (CREB binding protein)/p300 qui est un facteur stimulant l'activité transcriptionnelle de différentes classes de facteurs de transcription. CBP possède une activité qui acétyle les histones (HAT, histone acetyl transferase) ce qui permet de décondenser les interactions entre l'ADN et les nucléosomes, facilitant ainsi l'accès des coactivateurs à la matrice d'ADN. Les coactivateurs de la famille p160 ou les SRCs (steroid receptor coactivator), sont des facteurs qui stimulent spécifiquement l'activité transcriptionnelle des récepteurs nucléaires. Ces derniers possèdent également une activité HAT (Xu et al., 1999) (Westin et al., 2000). Les mécanismes d'action des coactivateurs seront discutés plus en détail dans la section 1.3.4.2. Les récepteurs nucléaires peuvent également interagir avec des corepresseurs, NCoR (nuclear receptor corepressor) et SMRT (silencing mediator of retinoid and thyroid receptor), et ces derniers s'associent à des facteurs ayant une activité histones déacétylases (HD, histone deacetylase) HDAC (histone deacetylase) et mSIN3 (mammalian Sin3 protein)

(Fig. 1.4). Les HD rétablissent la structure nucléosomale en restreignant l'accès des facteurs de transcription au promoteur (Xu et al., 1999).



Adapté de L. Xu, *Cur. Opin. Gen. & Dev.* 1999

Figure 1.4 Les complexes de coactivateurs font le lien entre la machinerie de transcription de base et les facteurs de transcription. Le complexe SWI/SNF est impliqué dans le remodelage de la chromatine via un mécanisme qui dépend de l'hydrolyse de l'ATP. CBP et SRCs sont des coactivateurs qui font le pont entre les facteurs de transcription (FT) et les facteurs de transcription généraux (FTG). Ces complexes de coactivateurs possèdent une activité histone acétyltransférase qui permet de relâcher la structure ADN/nucléosome. Les corepresseurs NCoR/SMRT recrutent les histones déacétylases au niveau des facteurs de transcription.

1.3. RÉCEPTEURS NUCLÉAIRES

1.3.1. FONCTION DES RÉCEPTEURS NUCLÉAIRES

Les hormones jouent des rôles très importants autant au cours du développement, de la différenciation que dans le maintien de l'homéostasie de l'adulte. Certaines hormones lient des récepteurs membranaires alors que d'autres hormones exercent leur action en liant des récepteurs nucléaires (RN). Les RN traduisent les effets de petites hormones lipophiliques en une réponse transcriptionnelle (Mangelsdorf et al., 1995; Evans, 1988).

1.3.2. STRUCTURE DES RÉCEPTEURS NUCLÉAIRES

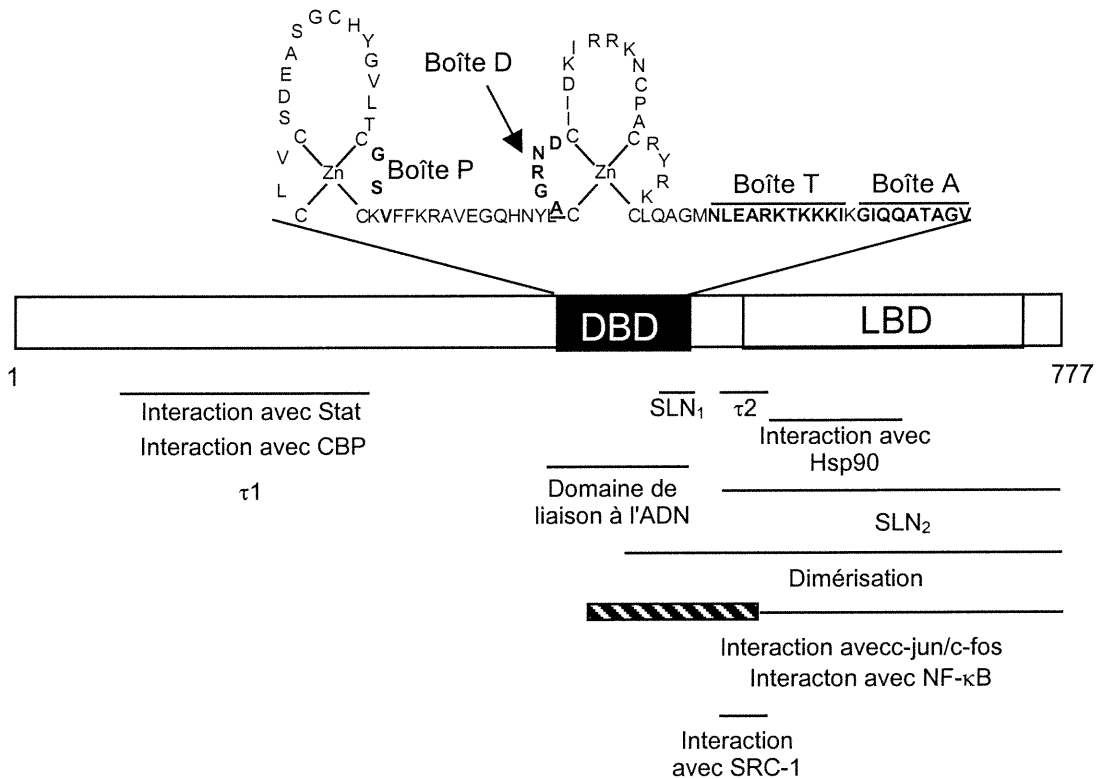
Les RN partagent une structure commune et ils sont caractérisés par leur domaine de liaison à l'ADN (DBD, DNA-binding domain) qui est formé de deux doigts de

zinc hautement conservés. Ce domaine est responsable de la reconnaissance et de la liaison des RN à des éléments de réponse localisés dans les régions promotrices (Berg, 1989; Klug and Schwabe, 1995). De plus, le DBD est formé d'une interface responsable de la dimérisation des RN. La région N-terminale des RN est la région la moins conservée entre les membres de cette super-famille, mais elle contient un domaine d'activation autonome qu'on appelle le domaine AF-1 (activation fonction 1) ou le domaine $\tau 1$. Le domaine de liaison du ligand (LBD, ligand-binding domain) localisé dans la région C-terminale des RN est responsable de la reconnaissance du ligand, et donc de la sélectivité et de la spécificité de la réponse physiologique. Les différents domaines des récepteurs nucléaires sont présentés dans le contexte du récepteur aux Gc à la figure 1.5. La liaison du ligand au LBD induit un changement de conformation responsable du passage du RN d'un état inactif à un état actif. La région C-terminale des RN contient également une interface essentielle pour la dimérisation des RN, un signal de localisation nucléaire et des régions impliquées dans l'interaction avec les coactivateurs et les corépresseurs ainsi qu'avec les protéines de choc thermique qui maintiennent les RN dans le cytoplasme en absence d'hormone. La nature du changement de conformation du RN suite à la liaison du ligand a récemment été mise à jour grâce à des études de cristallographie sur des RN en présence d'un agoniste ou d'un antagoniste (Shiau et al., 1998; Nolte et al., 1998). La liaison du ligand agoniste induit un changement de conformation qui implique un repositionnement de l'hélice la plus C-terminale du LBD, l'hélice 12. Ce changement est essentiel pour mettre à jour le domaine AF-2 (activation fonction 2). Des mutations dans cette hélice abolissent l'activité du domaine AF-2 mais n'ont pas d'effet sur la liaison du ligand ou de l'ADN (Feng et al., 1998). Il a récemment été démontré que la liaison du ligand au LBD induit un changement de conformation de l'hélice 1 du LBD et que ce changement permet de stabiliser la structure du LBD (Pissios et al., 2000).

1.3.3. CLASSIFICATION DES RÉCEPTEURS NUCLÉAIRES

La super-famille des RN est formée de quatre sous-familles. Les RN peuvent être classés selon leurs propriétés de liaison à l'ADN et leurs propriétés de dimérisation. Le premier groupe est formé des récepteurs aux hormones stéroïdes. Ces récepteurs forment des homodimères suite à la liaison de leur ligand et lient des demi sites d'ADN organisés en répétitions inversées. Le second groupe de RN est formé de récepteurs dont on connaît le ligand (hormone thyroïde, acide rétinoïque tout-trans, 1,25-(OH)₂-Vitamine D₃, éicosanoïdes, ecdysone) et qui forment des hétérodimères avec le

récepteur de l'acide rétinoïque (RXR, retinoid X receptor). Ces hétérodimères lient de façon générale des répétitions directes. Finalement il y a le groupe des RN orphelins, c'est-à-dire les RN dont le ligand n'a pas encore été identifié. Ce groupe est séparé en deux sous-groupes, les RN orphelins qui lient l'ADN sous forme d'homodimères et les RN orphelins qui lient l'ADN sous forme de monomères (Mangelsdorf et al., 1995).



Adapté de A. Vottero, TEM 1999

Figure 1.5 Structure du récepteur aux glucocorticoïdes.

1.3.4. FACTEURS RÉGLANT L'ACTIVITÉ TRANSCRIPTIONNELLE DES RÉCEPTEURS NUCLÉAIRES

Plusieurs protéines interagissant avec les RN ont été identifiées. Parmi celles-ci on retrouve des facteurs de la machinerie transcriptionnelle de base comme TFIIB et les TAFs. La régulation de l'activité transcriptionnelle des RN nécessite également le recrutement de coactivateurs/corépresseurs qui régulent le remodelage de la chromatine par acétylation ou désacétylation des histones (voir section 1.2.3. et Fig. 1.4).

1.3.4.1. Les corépresseurs

Différentes études suggèrent que des cofacteurs/adaptateurs n'ayant aucune activité spécifique pour lier l'ADN sont importants pour la régulation de l'activité

transcriptionnelle des RN. Une vaste quantité de protéines interagissant avec les RN ont été identifiées au cours des dernières années. Parmi celles-ci il y a les corépresseurs NCoR et SMRT qui interagissent avec les RN en absence de leur ligand. Les corépresseurs possèdent un domaine de répression transférable et ils peuvent interagir avec des complexes contenant des protéines ayant une activité HD. (Horlein et al., 1995; Chen and Evans, 1995). NCoR et SMRT peuvent être également recrutés par le récepteur aux œstrogènes (ER, estrogen receptor) lorsqu'il est lié par un antagoniste, et ce recrutement est essentiel pour une activité antagoniste complète (Zhang et al., 1998; Smith et al., 1997).

1.3.4.2. Les coactivateurs

D'autres protéines s'associant au RN suite à la liaison de leur ligand ont été identifiées. Ce sont des coactivateurs. Parmi ceux-ci on retrouve le coactivateur/cointégrateur CBP/p300 (Kamei et al., 1996a; Chakravarti et al., 1996) et les coactivateurs de la famille p160 (Hong et al., 1997; Voegel et al., 1998).

1.3.4.2.1. Le cointégrateur CBP/p300

CBP et p300 sont des protéines qui interagissent avec différents facteurs de transcription et avec des composantes de la machinerie de transcription de base. CBP fait le pont entre ces deux classes de protéines. La région N-terminale de CBP interagit directement avec les RN lorsqu'ils sont activés par la liaison de leur ligand. La micro-injection d'anticorps dirigés contre CBP bloque l'activation de la transcription induite par le ligand de RAR, RXR ou GR (Kamei et al., 1996b; Chakravarti et al., 1996), suggérant que CBP est un coactivateur essentiel pour l'activité transcriptionnelle des RN. Des activateurs de protéines kinases comme le facteur de croissance épidermique ou l'AMP cyclique (AMPC) peuvent induire la phosphorylation de CBP, et cette phosphorylation augmente le potentiel de coactivation de CBP (Janknecht and Hunter, 1996a). CBP est donc un intégrateur de différentes voies métaboliques ce qui entraîne l'activation de la transcription des gènes (Janknecht and Hunter, 1996b). De plus, CBP interagit avec SRC-1, SRC-2 et SRC-3, trois membres de la famille p160 (Yao et al., 1996).

1.3.4.2.2. Les membres de la famille p160.

SRC-1/NCoA-1 a été le premier coactivateur spécifique des RN à être cloné et caractérisé (Onate et al., 1995). SRC-1 a été identifié par la méthode du double hybride dans la levure avec une protéine encodant le LBD du récepteur à la progestérone (PR,

progesterone receptor). Il a été démontré que SRC-1 peut interagir avec PR, GR (glucocorticoid receptor), ER, TR (thyroid hormone receptor), RXR, HNF-4 (hepatocyte nuclear factor 4) et PPAR γ (peroxisome proliferator activated receptor γ) afin de potentialiser leur activité transcriptionnelle lorsqu'ils sont activés par la liaison de leur ligand (McKenna et al., 1999a; McKenna et al., 1999b). SRC-1 possède deux domaines d'activation autonomes (Onate et al., 1998). Il peut interagir avec des facteurs de la machinerie de transcription de base (TFIIB et TBP) (Takeshita et al., 1996). Il existe deux autres membres de la famille p160 qui partagent une très grande homologie avec SRC-1: SRC-2/GRIP1/Tif-2/NCoA-2 (Voegel et al., 1996; Hong et al., 1997; Hong et al., 1996; Torchia et al., 1997) et SRC-3/pCIP/RAC3/ACTR/AIB-1/TRAM1 (Chen et al., 1997a; Li et al., 1997; Anzick et al., 1997; Arai et al., 1997). Des études d'inactivation du gène codant pour SRC-1 chez la souris suggèrent que les facteurs SRC jouent des rôles redondants puisque ces souris n'ont aucun phénotype marqué (Xu et al., 1999; McKenna et al., 1999a; Freedman, 1999). Tout comme SRC-1, SRC-2 s'associe aux RN (RAR α (retinoic acid receptor), ER et PR) activés par la liaison de leur ligand et possède deux domaines d'activation autonomes (McKenna et al., 1999a; McKenna et al., 1999b). SRC-3 quant à lui interagit avec RAR, TR, RXR, GR, PR et ER suite à la liaison de leur ligand. Toutefois, SRC-3 peut également stimuler l'activité transcriptionnelle de différents autres facteurs de transcription comme la protéine CREB (c-AMP-response element binding protein) (Torchia et al., 1997).

Des études de structure/fonction des coactivateurs SRCs ont révélé la présence de motifs LXXLL essentiels pour interagir avec les RN et CBP (Heery et al., 1997; McInerney et al., 1998). Ces motifs sont essentiels pour reconnaître le domaine AF-2 des RN. Toutefois, il y a eu récemment plusieurs résultats expérimentaux suggérant que les facteurs SRCs puissent également interagir avec les RN même s'ils ne lient pas leur ligand (Hittelman et al., 1999; Webb et al., 1998; Onate et al., 1998; Alen et al., 1999; Tremblay et al., 1999; Tremblay et al., 1997; Hammer et al., 1999). En effet, les coactivateurs de la famille SRC interagissent également avec le domaine AF-1 des RN et potentialisent l'activité transcriptionnelle de ce domaine en absence de liaison du ligand. Enfin, il a été démontré que tout comme CBP, les facteurs SRC peuvent subir des modifications post-traductionnelles suite à l'activation de différentes voies de signalisation. Ainsi, SRC-3 est phosphorylé par les MAPK (mitogen activated protein kinase) (de Mora and Brown, 2000) et SRC-1 est phosphorylé par ERK-2 (extracellular signal-regulated kinases) (Rowan et al., 2000). La phosphorylation des coactivateurs

SRCs augmente leur potentiel de coactivation. Ceci suggère que différentes voies métaboliques puissent réguler la fonction des SRCs et ainsi moduler leur effet de coactivateur sur les RN.

1.3.5. IMPLICATION DES RÉCEPTEURS NUCLÉAIRES DANS LA TRANSCRIPTION DU GÈNE DE LA POMC

1.3.5.1. Nur77/NGFI-B

NGFI-B(rat) (Nerve growth factor inducible-B) aussi connu sous le nom de Nur77(souris) est un récepteur nucléaire orphelin qui a initialement été cloné dans des cellules PC12 (pheocromocytome des surrénales) et des cellules fibroblastiques comme étant un gène à réponse immédiate suite à l'addition de sérum ou de facteurs de croissance comme le FGF (fibroblast growth factor) (Hazel et al., 1988). Nur77/NGFI-B s'est démarqué des autres RN par sa capacité d'activer la transcription en liant des séquences promotrices sous forme de monomère. En effet, un élément de réponse qui est reconnu par NGFI-B a été identifié par sélection génétique dans la levure, c'est le NBRE (NGFI-B response element) (Wilson et al., 1991). Ce motif de reconnaissance est le demi site reconnu par le récepteur des œstrogènes, 5'-AGGTCA-3', et cette séquence est précédée de deux adénines. Ces deux adénines sont reconnues par des acides aminés de NGFI-B (Wilson et al., 1992).

1.3.5.2. Homologie entre les membres de la famille Nur

NGFI-B partage une très grande homologie avec deux autres RN. Nurr1 (Nur-related factor 1) et NOR-1 (neuron derived orphan receptor). Ces trois RN orphelins forment la famille des facteurs Nur. Nurr1 a été isolé d'une librairie d'ADNc de cerveau de souris (Law et al., 1992). NOR-1 quant à lui a été identifié par homologie avec les récepteurs nucléaires à partir d'une lignée cellulaire neuronale entrée en apoptose (Ohkura et al., 1994). Nurr1 et NOR-1 sont très conservés par rapport à NGFI-B dans leur domaine de liaison à l'ADN, soit 92 et 91% d'identité, tandis que l'analogie est moins grande dans la région N-terminale et C-terminale (respectivement 27-35% et 67-54%) (Fig. 1.6) (Maira et al., 1998). NOR-1 et Nurr1 sont également des gènes à réponse précoce, mais contrairement à NGFI-B, l'expression de Nurr1 n'est pas induit par le KCl (Law et al., 1992). Ceci suggère que différents signaux régulent de façon préférentielle l'expression des facteurs Nur. Les trois membres de la famille Nur lient le NBRE.

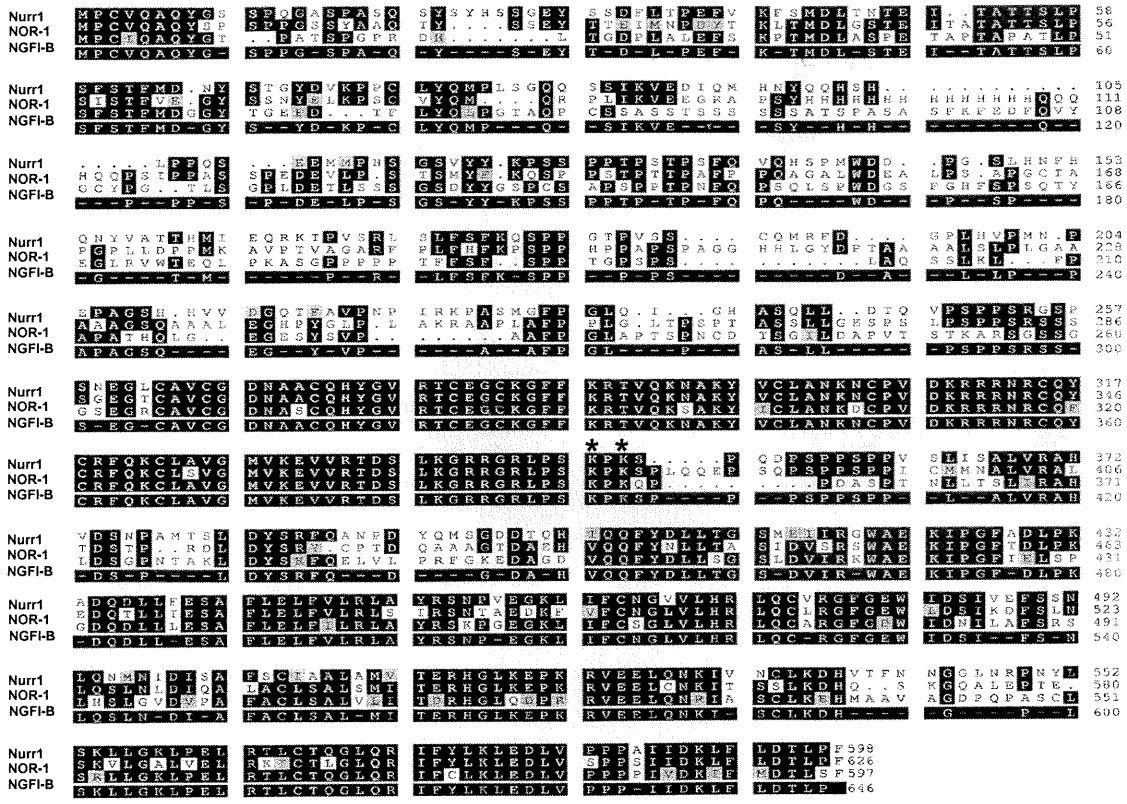


Figure 1.6 Homologie de séquence entre les facteurs Nur. Les boîtes noires représentent les acides aminés très conservés entre les facteurs Nur. Les étoiles représentent les résidus lysines conservés avec le récepteur aux androgènes, résidus qui sont acétylés par CBP.

1.3.5.3. Patron d'expression des facteurs Nur

Le patron d'expression de Nurr1 est très différent de celui de Nur77. Alors que Nur77 est exprimé dans la majorité des organes et tissus, Nurr1 est exprimé surtout dans le cerveau et ce très tôt au cours du développement, c'est-à-dire au jour embryonnaire 8. Nurr1 est le seul membre des facteurs Nur à être exprimé dans les neurones dopaminergiques. Nur77 quant à lui est surtout exprimé chez l'adulte. NOR-1 a un profil d'expression semblable à celui de Nur77 mais il apparaît plus précocement au cours du développement, c'est-à-dire au jour embryonnaire 8 (Law et al., 1992) (Zetterstrom et al., 1996). L'inactivation du gène de Nur77 chez la souris n'a entraîné aucun phénotype marqué (Lee et al., 1995b; Crawford et al., 1995; Cheng et al., 1997). Ceci est expliqué par une réponse compensatoire des autres membres de la famille Nur. Par contre, l'inactivation de Nurr1 entraîne un phénotype marqué qui est caractérisé par l'absence de système dopaminergique mésencéphalique (Zetterstrom et al., 1997). Le

rôle de Nur77 chez la souris pourra être élucidé lorsque des souris doubles mutantes pour NOR-1 et Nur77 auront été générées. Toutefois, il est clair que les facteurs Nur jouent des rôles parfois redondants.

1.3.5.4. Implications des facteurs Nur dans différentes voies de signalisation

1.3.5.4.1. Les facteurs Nur jouent un rôle important dans l'apoptose dans les cellules T

L'apoptose est un phénomène observé durant le développement de différents types cellulaires. C'est un processus de mort cellulaire qui est caractérisé par l'induction de nouveaux gènes et la fragmentation de l'ADN en fragments de la taille de nucléosomes (Cohen et al., 1992; Oppenheim, 1991; Blagosklonny, 2000). Le répertoire des cellules T est déterminé par une sélection positive et négative des thymocytes durant le développement du thymus. La majorité des thymocytes immatures qui sont auto-réactifs sont éliminés par sélection négative afin d'établir l'auto-tolérance immunologique (von Boehmer, 1994). Ce processus de sélection négative ou de délétion clonale se fait via un mécanisme impliquant l'apoptose.

On peut reproduire l'apoptose dans les cellules T en mettant des hybridomes de cellules T en présence d'un anti-CD3 qui est reconnu par les récepteurs de l'antigène aux cellules T (TCR, T-cell receptor) (Nossal, 1994). L'apoptose induite par le TCR requiert l'expression de nouveaux gènes. Nur77 est l'un de ces gènes et il a été identifié dans le processus d'apoptose des cellules T par hybridation substractive (Woronicz et al., 1994; Liu et al., 1994). L'expression de Nur77 est induite lorsque les cellules T entrent en apoptose et la présence d'un anti-sens ou d'un dominant négatif de Nur77 prévient l'apoptose induite par le TCR. L'expression constitutive de Nur77 entraîne la mort cellulaire massive. Ces résultats suggèrent que Nur77 joue un rôle très important dans le déclenchement de l'apoptose des cellules T. Toutefois, les souris déficientes pour le gène de Nur77 ne présentent aucun défaut dans la délétion clonale du répertoire des cellules T (Lee et al., 1995b). Les rôles de Nurr1 et de NOR-1 ont été caractérisés dans les cellules T. Dans les thymocytes et dans les hybridomes de cellules T, NOR-1 est induit rapidement en réponse au signal du TCR avec une cinétique similaire à celle de Nur77. Par contre Nurr1 n'est pas détecté dans les mêmes conditions. De plus, comme pour Nur77, l'expression constitutive de NOR-1 entraîne la mort cellulaire massive (Cheng et al., 1997). Ainsi, Nur77 et NOR-1 partagent un rôle commun dans l'apoptose induite par le TCR. Par contre, aucun modèle expliquant le rôle des facteurs

Nur dans l'apoptose n'a été apporté puisque jusqu'à présent, aucun gène cible pour Nur77 ou NOR-1 n'a encore été identifié au cours de l'apoptose induite par le TCR. Toutefois, il a été démontré que Nur77 et Notch-1 interagissent et que cette interaction empêche l'apoptose dans les cellules T (Jehn et al., 1999).

Il a également été démontré que TR3, l'homologue humain de NGFI-B, peut réguler l'apoptose par un mécanisme qui ne nécessite pas l'activité transcriptionnelle de TR3, mais plutôt sa capacité d'être transloqué dans la mitochondrie pour initier l'apoptose. TR3 semble réguler l'apoptose par un mécanisme qui est indépendant de la régulation transcriptionnelle. En réponse à différents stimuli apoptotiques, TR3 est transloqué du noyau vers le cytoplasme où il va cibler la mitochondrie afin de perméabiliser la membrane mitochondriale et entraîner la libération du cytochrome c et enfin entraîner la mort cellulaire (Li et al., 2000). Contrairement aux autres RN, les facteurs Nur semblent se distinguer par leurs mécanismes d'action.

1.3.5.4.2. Les facteurs Nur modulent la voie de signalisation médiée par l'acide rétinoïque

Les rétinoïdes sont des molécules de signalisation qui sont essentielles pour le développement embryonnaire et la différenciation cellulaire ou l'homéostasie de l'adulte. Chez l'embryon, les rétinoïdes sont impliqués dans la formation et le développement du système nerveux, dans la différenciation craniofaciale et dans la morphogenèse des membres (Mangelsdorf et al., 1992). Le récepteur de l'acide rétinoïque RXR lie l'acide rétinoïque 9-*cis* (RA 9-*cis*). RXR est un partenaire général d'hétérodimérisation avec d'autres récepteurs nucléaires et son rôle est d'augmenter l'affinité et la sélectivité des dimères pour des éléments de réponse. Les hétérodimères impliquant RXR peuvent être activés par deux ligands, celui de RXR (RA 9-*cis*) et celui de son partenaire de dimérisation. L'affinité de RXR pour son ligand peut être modulée par des effets allostériques induits par le partenaire et RXR peut lui aussi moduler l'activité transcriptionnelle de ce partenaire. Ainsi, RXR est un important composant de la formation d'hétérodimères et il est essentiel pour générer la diversité de la réponse hormonale (Mangelsdorf and Evans, 1995; Blanchet and Michaille, 1998).

Tout comme le récepteur de l'acide rétinoïque (RAR), le récepteur de l'hormone thyroïdienne (TR), le récepteur de la vitamine D (VDR) ou le récepteur des proliférateurs de peroxyosomes (PPAR), Nur77 et Nurr1 forment aussi des hétérodimères avec RXR (Perlmann and Jansson, 1995). Ces hétérodimères lient des séquences d'ADN

répétées qui sont orientées dans la même direction. Les hétérodimères Nur/RXR lient ces répétitions directes séparées de 5 nucléotides (DR5) de façon similaire à l'hétérodimère RAR/RXR, mais au lieu d'être inhibé par RAR, le potentiel d'activation de RXR est augmenté par Nur77 et/ou Nurr1. Par contre, NOR-1 ne peut promouvoir la signalisation par RXR à cause de son incapacité à former des hétérodimères avec RXR (Zetterstrom et al., 1996). Le NurRE qui est un élément de réponse qui reconnaît des dimères de facteurs Nur (Philips et al., 1997a) lie également des hétérodimères de Nur/RXR. Contrairement à l'hétérodimère Nur/RXR sur l'élément DR5, RXR antagonise l'activité transcriptionnelle de Nur77 ou Nurr1 au lieu de coopérer avec ces derniers (Maira et al., 1999; Kang et al., 2000). Ainsi, l'effet transcriptionnel de l'hétérodimère Nur/RXR varie en fonction de l'élément de réponse qui est lié par cet hétérodimère. Les caractéristiques de dimérisation de ces deux classes de récepteurs nucléaires permettent de moduler la voie de signalisation des facteurs Nur par la voie de signalisation des rétinoïdes. Par exemple, l'apoptose induite par le TCR et qui dépend de Nur77 (section 1.3.5.4.1) est inhibée par les rétinoïdes (Bissonnette et al., 1995; Iwata et al., 1992; Rusak et al., 1992). Il est possible que RXR forme des hétérodimères avec Nur77 afin de bloquer l'effet de Nur77 sur les gènes proapoptotiques qui sont sous le contrôle d'un NurRE (Maira et al., 1999).

La translocation de Nur77 du noyau vers le cytoplasme semble également être un mécanisme important pour la régulation de la signalisation modulée par l'acide rétinoïque. En effet, la phosphorylation de la sérine 105 de Nur77 dans les cellules PC12 suite à un traitement au NGF (Nerve Growth factor) entraîne l'exportation du complexe Nur77/RXR du noyau vers le cytoplasme. Nur77 phosphorylé est emprisonné dans le cytoplasme et retient RXR dans le cytoplasme. De plus Nur77 phosphorylé interagit avec RXR nouvellement synthétisé et le séquestre dans le cytoplasme. L'activité transcriptionnelle régulée par RXR est donc inhibée. Ce mécanisme d'exportation de Nur77 du noyau vers le cytoplasme résulte en un antagonisme transcriptionnel entre la signalisation des rétinoïdes et de NGF (Katagiri et al., 2000).

Les mécanismes de modulation de la réponse à l'acide rétinoïque par Nur77 n'impliquent pas seulement la formation d'hétérodimères Nur77/RXR. En effet, COUP-TF (chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor), un RN orphelin, lie des éléments de réponse à l'acide rétinoïque (RARE, retinoic acid response element) et inhibe l'activité induite par l'acide rétinoïque en compétitionnant pour le site de liaison. Nur77 stimule la transcription induite par l'acide rétinoïque en formant des

hétérodimères avec COUP-TF séquestrant ainsi ce dernier loin du RARE (Wu et al., 1997).

1.3.5.4.3. Les facteurs Nur sont impliqués aux trois niveaux de l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien

L'analyse du patron d'expression de NGFI-B et de Nurr1 chez le rat a révélé l'induction de ces deux facteurs dans l'hypothalamus et dans l'hypophyse suite à un stress (Honkaniemi et al., 1994; Saucedo-Cardenas and Conneely, 1996). C'est pourquoi plusieurs groupes ont décidé d'étudier le rôle des facteurs Nur au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien.

1.3.5.4.3.1. Les facteurs Nur au niveau de l'hypothalamus

Différents groupes ont démontré que NGFI-B est induit au niveau de l'hypothalamus. Lorsque des rats sont soumis à un traitement avec de l'oxyde nitrique, le niveau d'ACTH plasmatique augmente de façon significative. Ce traitement entraîne également une augmentation de l'expression de NGFI-B, du CRH, de la vasopressine et du récepteur au CRH dans le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (Rivier and Shen, 1994). Suite à un traitement qui consiste à injecter du CRH de façon intracérébrale chez le rat, l'expression de NGFI-B est augmentée avant que celle du CRH ne le soit, suggérant ainsi que NGFI-B active la transcription du CRH (Parkes et al., 1993). Plus récemment il a été démontré que Nurr1 et NGFI-B peuvent lier une séquence NBRE localisée dans le promoteur du CRH et ainsi activer la transcription du CRH dans des cellules AtT-20 (Murphy and Conneely, 1997).

1.3.5.4.3.2. Les facteurs Nur au niveau de l'hypophyse

Différents groupes ont montré que le CRH induit l'expression des facteurs Nur dans les cellules corticotrophes AtT-20 (Murphy and Conneely, 1997; Philips et al., 1997a; Maira et al., 1999). De plus un NBRE a été identifié dans la région proximale du promoteur du gène de la POMC et cette séquence chevauche un élément de réponse négatif aux Gc, qui a déjà été caractérisé (Drouin et al., 1989). Le CRH induit la transcription de la POMC et cette activation est médiée par la voie de l'AMPc (Labrie et al., 1982; Aguilera et al., 1983). En transfection, le NBRE du promoteur de la POMC s'est avéré être une cible pour l'activation de la transcription de la POMC par la forskoline, mais d'autres séquences dans le promoteur de la POMC semblent être essentielles pour cette réponse puisqu'une mutation ponctuelle du NBRE diminue le niveau d'expression de

base du promoteur alors que la réponse à la forskoline est toujours observée mais avec une moins grande amplitude (Murphy and Conneely, 1997). Une surexpression de Nur77 ou de Nurr1 mime l'effet de la forskoline et les facteurs Nur peuvent lier le NBRE du gène de la POMC dans des expériences de retardement sur gel (Murphy and Conneely, 1997). Des expériences similaires ont été faites par notre groupe de recherche. Le CRH et la forskoline induisent l'expression de la POMC, mais en agissant sur une cible localisée dans la région distale du promoteur. Ce nouvel élément de réponse que nous avons appelé le NurRE (Nur response element) lie des homo- ou hétérodimères de facteur Nur (Philips et al., 1997a; Maira et al., 1999). Cette nouvelle cible de facteurs Nur est formée de deux demi-sites inversés apparentés au NBRE 5'-AAAGGTCA-3' et qui sont séparés par 6 paires de bases (pb) (FIG 1.7). Lorsque le NurRE est placé en trois copies devant le promoteur minimal de la POMC, il est beaucoup plus actif en réponse au CRH ou en présence de Nur77 qu'une construction similaire contenant trois copies du NBRE. L'activité transcriptionnelle induite par le CRH est bloquée en présence d'un mutant dominant négatif de Nur77. Ainsi, le NurRE de POMC est essentiel pour observer la réponse transcriptionnelle médiée par le CRH ou la forskoline.

1.3.5.4.3.3. Les facteurs Nur au niveau des surrénales

L'ACTH augmente la transcription du gène codant pour l'enzyme stéroïde 21-hydroxylase (21-(OHase)). Un élément de réponse très apparenté au NBRE a été identifié dans le promoteur du gène de la 21-(OHase). NGFI-B est très fortement exprimé dans le cortex des surrénales de rat adulte. De plus, lorsqu'on traite des cellules du cortex surrénalien en culture (Y1) avec de l'ACTH il y a une augmentation rapide de l'expression d'une forme transcriptionnellement active de NGFI-B (Li and Lau, 1997). Des expériences de retardement sur gel et d'empreinte à la DNase montrent que Nur77 interagit avec le NBRE du promoteur de la 21-(OHase) (Wilson et al., 1993). Nurr1 est également induit dans les surrénales après injection d'ACTH chez la souris (Davis and Lau, 1994). L'inactivation du gène Nur77 chez la souris n'a causé aucun déficit dans les fonctions des surrénales ou dans la structure et le fonctionnement de l'axe HHS. Toutefois, l'expression de Nurr1 est augmentée dans les souris déficientes comparativement aux souris normales, suggérant que Nurr1, et probablement NOR-1, jouent un rôle compensatoire chez ces souris (Crawford et al., 1995).

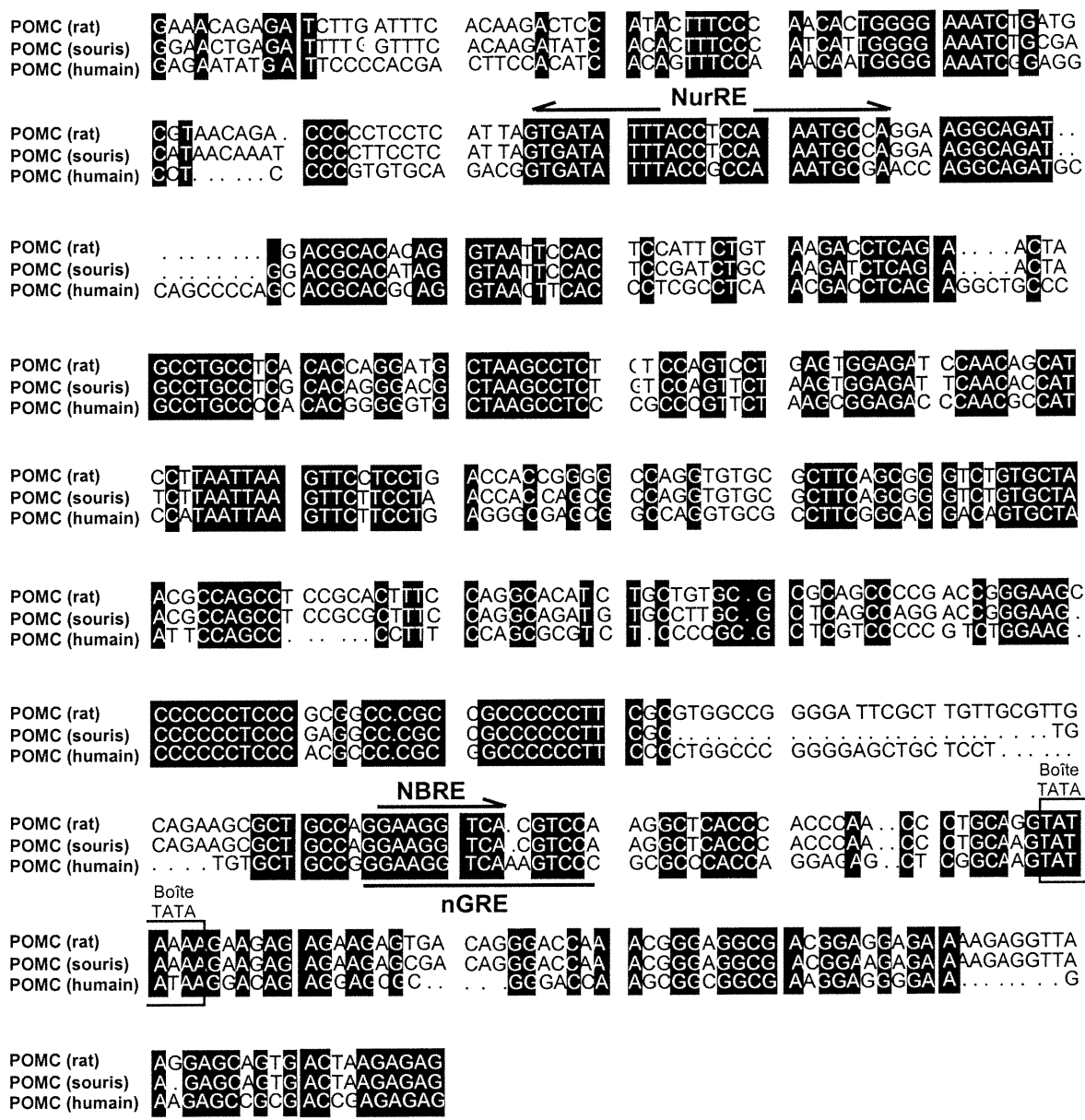


Figure 1.7 Alignement de séquences du promoteur de la POMC chez le rat, la souris et l'humain. Les boîtes noires représentent les séquences conservées entre les espèces.

1.3.5.5. Analyse fonctionnelle de Nur77/NGFI-B

1.3.5.5.1. Domaine de transactivation de Nur77/NGFI-B

Les études de structure/fonction des facteurs Nur ont surtout été faites sur Nur77/NGFI-B. Les domaines d'activation transcriptionnelle de Nur77/NGFI-B ont été identifiés à l'aide d'expériences de transfection avec des mutants de délétion (Fig. 1.8). Différents groupes ont démontré que l'activité transcriptionnelle de Nur77 dépendante du NBRE est imputable essentiellement à son domaine N-terminal. En effet, lorsque la région entre les acides aminés (a.a.) 10 et 37 est délétée, il y a une perte d'environ 90 % de l'activité transcriptionnelle de Nur77. Un second domaine localisé entre les a.a. 101 à 161 joue également un rôle dans l'activité transcriptionnelle puisque lorsqu'il est délété, on perd complètement l'activité transcriptionnelle de Nur77. En général, pour les RN, la région C-terminale abrite un domaine d'activation, l'AF-2, qui dépend de la liaison du ligand. La région C-terminale de Nur77 ne semble pas avoir de domaine d'activation puisque la délétion complète du C-terminal n'entraîne pas de diminution de son activité transcriptionnelle. Toutefois, comme le ligand pour les facteurs Nur est inconnu, il est possible que le domaine AF-2 n'ait pas été détecté. Il est important de noter que la délétion du domaine contenu entre les a.a. 499 à 556 résulte en une perte de l'activité transcriptionnelle de Nur77. Ce domaine est formé de répétitions d'heptades qui sont conservées entre les différents RN. Il est possible de restaurer l'activité transcriptionnelle de Nur77 en délétant des régions adjacentes à ce domaine. Ceci suggère que le domaine contenu entre a.a. 499 à 556 empêche des protéines inhibitrices de se lier à Nur77, et lorsqu'on enlève complètement les régions adjacentes de ce domaine, on retrouve une activité transcriptionnelle complète (Davis et al., 1991; Paulsen et al., 1992; Davis et al., 1993). Il a été démontré que ces domaines sont importants pour l'homodimérisation, la liaison du ligand et l'activité transcriptionnelle du récepteur aux œstrogènes (Fawell et al., 1990). De plus, des mutants de GR avec des délétions similaires se comportent de la même façon que ces mutants de Nur77/NGFI-B (Hollenberg et al., 1987). Notre groupe a démontré que les domaines de transactivation de Nur77 identifiés comme étant essentiels pour l'activité dépendante du NBRE sont également essentiels pour l'activité dépendante du NurRE (Maira et al., 2000). Ainsi, la formation de dimères n'entraîne pas de changement conformationnel qui pourrait révéler

la présence d'un autre domaine essentiel pour l'activité transcriptionnelle des facteurs Nur.

Le domaine de liaison à l'ADN de Nur77/NGFI-B a été très bien caractérisé. Une région dans la partie la plus C-terminale du DBD, la boîte A, est très importante pour la reconnaissance des deux adénines localisé en 5' du NBRE (Fig. 1.8) (Wilson et al., 1992). Le DBD contient deux signaux de localisation nucléaire (SLN), toutefois, comme le ligand de Nur77 est inconnu, il est possible qu'il y ait un autre SLN qui soit mis à jour suite à la liaison du ligand dans la région C-terminale, comme cela a été démontré pour GR (Fig1.5) (Picard and Yamamoto, 1987; Savory et al., 1999). Enfin, le DBD de Nur77 est suffisant pour former des dimères (Maira et al., 2000) et ce domaine est impliqué dans l'hétérodimérisation avec le RN COUP-TF (Wu et al., 1997).

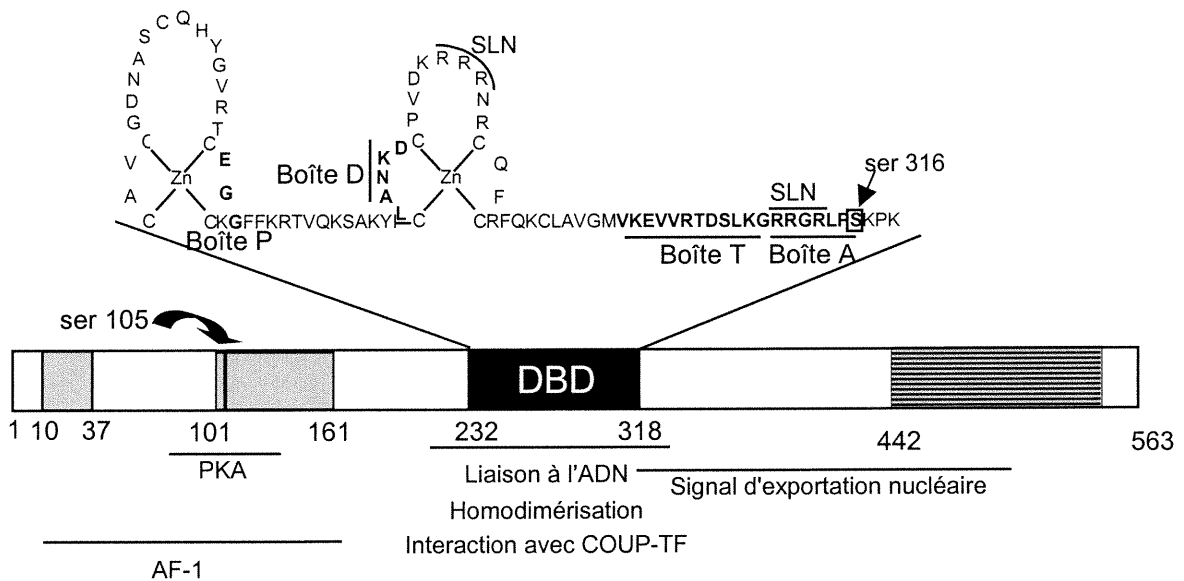


Figure 1.8 Structure de Nur77/NGFI-B.

1.3.5.5.2. La phosphorylation de Nur77/NGFI-B joue un rôle important pour la régulation de son activité transcriptionnelle

La phosphorylation de Nur77/NGFI-B par différentes kinases est impliquée dans la régulation de son activité transcriptionnelle, dans sa capacité de lier l'ADN et dans sa capacité de transloquer du noyau vers le cytoplasme. En effet Nur77/NGFI-B est phosphorylé sur la sérine 316 dans des cellules PC12 soit par PKA ou par induction avec le NGF (Fig. 1.8) (Hirata et al., 1993; Hirata et al., 1995; Katagiri et al., 2000). La

phosphorylation de ce résidu sérine entraîne une diminution de la liaison de Nur77 sur son élément de réponse. Toutefois, l'effet de PKA sur la phosphorylation de Nur77 varie en fonction de la nature du stimulus. Alors que le NGF réprime l'activité transcriptionnelle de Nur77, la dépolarisation des membranes stimule l'activité transcriptionnelle de Nur77 (Hazel et al., 1991; Katagiri et al., 1997). En effet, dans ce cas précis, PKA augmente l'activité transcriptionnelle de Nur77 en agissant sur la région N-terminale de Nur77. Notre groupe a délimité cette région entre les a.a 74 à 124. Cette région contient plusieurs résidus qui pourraient être des cibles potentielles de PKA (Maira et al., 2000). Il a été démontré que la région C-terminale de Nur77 est impliquée dans l'exportation nucléo-cytoplasmique (Davis et al., 1993). Un autre signal important pour l'exportation nucléaire se trouve dans la région N-terminale. La sérine 105 est sujette à la phosphorylation et la phosphorylation de ce résidu est essentielle pour permettre la translocation de Nur77 du noyau vers le cytoplasme (Katagiri et al., 2000). Ainsi, l'activation de différentes voies métaboliques permet de moduler l'activité de Nur77/NGFI-B via différents processus de phosphorylation.

1.3.5.5.3. Différence et/ou ressemblance des fonctions entre les facteurs Nur

Les études portant sur la caractérisation des domaines de Nurr1 et de NOR-1 sont beaucoup moins bien détaillées que celles relatées pour Nur77/NGFI-B. Il a tout de même été démontré que les régions N-terminales de Nurr1 et NOR-1 sont actives transcriptionnellement. Le domaine C-terminal de NOR-1 a un profil d'activité transcriptionnelle similaire à celui de Nur77, c'est-à-dire, qu'il existe une région qui, lorsque délétée, restaure l'activité transcriptionnelle à un niveau similaire à celui de NOR-1 pleine longueur (Fernandez et al., 2000). Par contre, le domaine C-terminal de Nurr1 contient une région qui contribue à son activité transcriptionnelle. Ce domaine de transactivation est dépendant du contexte cellulaire (Castro et al., 1999). Puisque la région C-terminale des facteurs Nur est assez bien conservée, on peut se demander si l'activité AF-2 de Nurr1 n'est pas régulée par un mécanisme intracrine, c'est-à-dire que le ligand de Nurr1 serait produit dans la cellule. Ce mécanisme d'action a été observé comme étant essentiel pour la régulation de l'activité transcriptionnelle du récepteur nucléaire orphelin LXR α . En effet, les produits du métabolisme du mévalonate régulent l'activité transcriptionnelle de LXR α (Forman et al., 1997). De façon étonnante, Nurr1 ne semble pas interagir avec SRC-1. Son activité transcriptionnelle dépendante du NBRE n'est pas activée par SRC-1 (Castro et al., 1999). Ceci est un résultat étonnant puisque

la majorité des RN interagissent avec les coactivateurs. La liaison de Nurr1 en monomère sur son élément de réponse pourrait expliquer cette absence d'effet, mais il a été démontré que SF-1 qui est un autre RN orphelin qui agit en monomère interagit avec SRC-1 et que son activité transcriptionnelle est augmentée de façon AF-2-dépendante et indépendante (Crawford et al., 1997; Ito et al., 1998; Hammer et al., 1999).

Les facteurs Nur sont donc impliqués dans différents systèmes. Autant au niveau du système neuroendocrinien ou du système lymphoïde la présence des facteurs Nur semble être importante pour le maintien des fonctions cellulaires. Les facteurs Nur se distinguent des autres RN de par leur nature de gènes à réponse précoce et par leur mécanisme d'action.

1.3.5.6. Le récepteur des glucocorticoïdes

1.3.5.6.1. Le rôle des glucocorticoïdes

Le récepteur aux glucocorticoïdes (GR) fait partie de la sous-famille des récepteurs aux hormones stéroïdiennes. Il existe quatre groupes d'hormones stéroïdiennes: la progestérone, les androgènes, les œstrogènes et les corticostéroïdes. Elles sont toutes dérivées d'un précurseur commun, le cholestérol. Les corticostéroïdes peuvent être divisés en deux groupes: les minéralocorticoïdes, responsables de la balance en électrolytes et les glucocorticoïdes responsables du contrôle du métabolisme des carbohydrates, de l'induction de l'activité de différentes enzymes impliquées dans la gluconéogenèse, de la stimulation de l'hématopoïèse, du contrôle du tonus musculaire et de la régulation de la réponse inflammatoire et de la réponse immunitaire. Les glucocorticoïdes sont synthétisés et sécrétés au niveau du cortex des surrénales et sont impliqués dans la régulation de différents processus physiologiques incluant la régulation du métabolisme des carbohydrates et des lipides, la modulation de la réponse immunitaire et inflammatoire ainsi que différentes réponses physiologiques comme la réponse au stress. Le niveau de Gc circulants est contrôlé de façon très stricte par l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien. À la naissance, les Gc en combinaison avec d'autres hormones activent des enzymes du foie, qui sont impliquées dans la gluconéogenèse. Parmi celles-ci on retrouve la glucose-6-phosphatase et la phosphoenolpyruvate carboxykinase. Les Gc jouent également un rôle important dans le développement des poumons et sont impliqués dans les fonctions des cellules épithéliales des alvéoles en induisant la production de surfactant. L'inactivation du gène

codant pour le récepteur aux Gc entraîne une mort rapide à la naissance dû à des problèmes respiratoires. En effet, les poumons de ces souris sont résorbés et un manque de surfactant est observé. Les enzymes gluconéogéniques sont absentes et les glandes surrénales sont environ deux fois plus grandes que celles des souris normales. Le cortex des glandes surrénales est formé de trois zones différentes, la zona glomérulosa qui produit les minéralocorticoïdes, la zona fasciculata et la zona reticularis qui produisent les Gc. Ce sont ces deux dernières zones qui sont responsables de l'expansion des glandes surrénales. En raison de l'absence d'inhibition de l'axe HHS normalement régulé par les Gc, la quantité totale de corticostéroïdes et les niveaux d'ACTH plasmatique sont 3 fois et 20 fois plus élevés chez les souris mutantes que chez les souris sauvages. (Schmid et al., 1995).

1.3.5.6.2. Mécanismes d'action des récepteurs aux glucocorticoïdes

La structure ainsi que la fonction des différents domaines de GR ont été étudiées de façon exhaustive. Les rôles des domaines de GR sont résumés dans la figure 1.5. GR est séquestré dans le cytoplasme par un complexe contenant les protéines de choc thermique hsp70, hsp56 et hsp90 (Beato et al., 1995; Owens-Grillo et al., 1995). Après avoir lié son ligand, GR est transloqué au noyau afin de lier des éléments de réponse à GR (GRE) sous forme d'homodimère. La liaison de GR au GRE entraîne une augmentation de la transcription des gènes cibles. Il existe des éléments de réponse négatifs à GR (nGRE). La liaison d'homodimères de GR ou de trois molécules de GR au nGRE (Drouin et al., 1993) entraîne une répression de la transcription. De tels éléments de réponse ont été observés dans le promoteur du gène de l'ostéocalcine (Aslam et al., 1995), de la POMC (Drouin et al., 1989), de la prolactine (Subramaniam et al., 1997), de l'IL-1 β (Zhang et al., 1997) ainsi que dans le promoteur du gène du CRH (Malkoski et al., 1997). GR peut également inhiber la transcription de différents gènes cibles en interférant avec d'autres voies de signalisation. En effet, GR antagonise l'activité transcriptionnelle de différents facteurs de transcription (AP-1/NF- κ B) en interagissant directement avec ces facteurs ou en séquestrant une protéine commune présente en quantité limitante dans la cellule (Ceci sera décrit plus en détail dans la section 1.3.5.6.2.1. et 1.3.5.6.2.2.).

Il existe deux isoformes de GR: GR α et GR β (Hollenberg et al., 1985). Ces deux récepteurs partagent les mêmes 720 premiers acides aminés, mais en raison d'un

épissage alternatif, leur structure diverge dans la région C-terminale. Les 50 derniers acides aminés de GR α sont remplacés par 15 acides aminés dans GR β le rendant incapable de lier son ligand. Ainsi, GR β agit sur GR α comme dominant négatif (Vottero and Chrousos, 1999).

1.3.5.6.2.1. Répression de l'activité AP-1 par GR

AP-1 est un facteur de transcription encodé par des proto-oncogènes impliqués dans différents aspects de la croissance cellulaire, de la différenciation et dans le développement. Ces protéines nucléaires font partie de la famille des protéines à crémaillère de leucines. Ces facteurs sont impliqués dans la dégradation du collagène, dans la dégradation des protéines de la membrane basale et dans la destruction massive du cartilage, des os et des tendons au cours de l'arthrite. Les facteurs AP-1 induisent l'expression de gènes qui codent pour des métalloprotéases comme la collagénase et la stromélysine. L'analyse du promoteur de la collagénase et de la stromélysine ont révélé la présence d'un élément AP-1. Cet élément est essentiel pour observer l'induction de l'expression de ces gènes par les phorbol esters, les médiateurs inflammatoires et les facteurs de croissance. Cet élément de réponse est également essentiel pour observer la répression de la transcription par les Gc. En effet, trois études indépendantes ont démontré que les Gc exercent leur action sur la transcription de ces gènes en antagonisant l'activité transcriptionnelle du facteur AP-1 (Fos/Jun) (Yang-Yen et al., 1990; Schule et al., 1990; Jonat et al., 1990). Cette répression se fait via un mécanisme qui implique une interaction directe entre GR et AP-1. GR et AP-1 antagonisent l'activité transcriptionnelle l'un de l'autre sur leurs éléments de réponse respectifs. Les domaines de liaison à l'ADN de GR (doigts de zinc) et de AP-1 (crémaillère de leucine) sont nécessaires pour l'antagonisme transcriptionnel. De plus, à l'aide d'expérience de retardement sur gel, il a été démontré que GR inhibe la liaison de AP-1 sur son élément de réponse en séquestrant ce dernier, et vice versa. Des études de structure/fonction ont démontré que lorsque le DBD de GR est muté de façon telle qu'il ne peut plus former d'homodimère, et ainsi, qu'il ne peut plus lier l'ADN, il peut toujours interagir avec AP-1 et antagoniser son activité transcriptionnelle démontrant que GR peut interagir avec AP-1 sous la forme de monomère (Fig. 1.9A) (Heck et al., 1994; Tuckermann et al., 1999). L'interaction directe entre GR et AP-1 n'est pas le seul mécanisme impliqué dans cet antagonisme transcriptionnel. En effet, le coactivateur CBP stimule l'activité transcriptionnelle de GR et des protéines AP-1. L'antagonisme de

l'activité transcriptionnelle de GR par AP-1 est levé lorsqu'il y a addition d'une quantité croissante de CBP (Kamei et al., 1996). Ainsi, la titration de l'activité transcriptionnelle de AP-1 par GR ou vice versa est due, du moins en partie, à la séquestration d'un cofacteur commun présent en quantité limitante dans la cellule par l'un ou l'autre des facteurs de transcription (Fig. 1.9B). GR peut également inhiber l'activation de AP-1 en prévenant la phosphorylation de c-jun sur les serines 63/73 en bloquant la voie de signalisation médiée par la JNK (jun amino-terminal kinase) (Caelles et al., 1997). Toutefois, ce résultat est très contesté car il n'a jamais été reproduit. Enfin, l'antagonisme transcriptionnel observé entre AP-1 et GR peut également se faire au niveau de leur expression (Vig et al., 1994). Ainsi, la régulation de l'activité AP-1 par GR est médiée par différents mécanismes impliquant des interactions protéine/protéine directe ou indirecte et/ou par la modulation de différentes voies de signalisation.

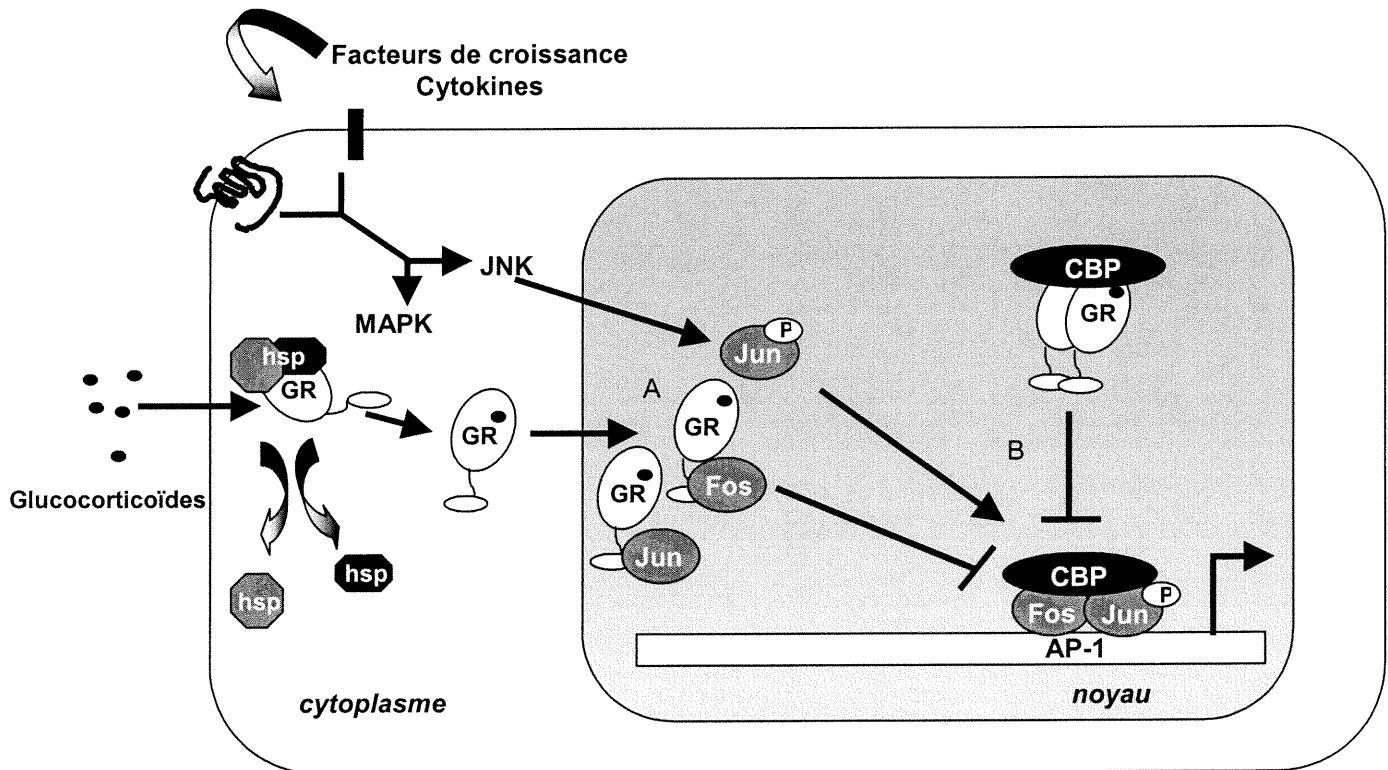


Figure 1.9 Régulation de l'activité AP-1 par les glucocorticoïdes. A) Interaction directe entre GR et AP-1. B) Séquestration d'un coactivateur commun à GR et AP-1.

1.3.5.6.2.2. Répression de l'activité NF- κ B par GR

NF- κ B a initialement été identifié pour son rôle dans la régulation de l'expression des chaînes kappa des immunoglobulines dans les cellules B. Il est formé d'un

hétérodimère comprenant une sous-unité de 50 KDa (p50/NF κ B1) et d'une sous-unité de 65 KDa (p65/Rel A). NF- κ B, qui est normalement séquestré dans le cytoplasme par une protéine inhibitrice, I κ B, est transloqué au noyau et induit la transcription de différents gènes cibles suite à la dissociation d'I κ B induite par différents stimuli comme des agents mitogènes, des cytokines, des lipopolysaccharides ou une infection virale (Scheinman et al., 1995a). NF- κ B joue un rôle central dans l'induction de plusieurs gènes codant entre autre pour IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-9, TNF α (Tumor necrosis factor), interféron- γ et le complexe majeur d'histocompatibilité de classes I et II. En plus d'être régulé par NF- κ B, plusieurs de ces gènes sont également régulés par AP-1 et une synergie entre NF- κ B et AP-1 peut également avoir lieu pour réguler la transcription de ces gènes. Les Gc jouent un rôle d'immunosuppresseur et d'agent anti-inflammatoire. La régulation de l'expression des gènes codant pour des cytokines par les Gc se fait via un mécanisme très similaire à ceux décrits pour le gène de la collagénase.

De façon très similaire à ce qui a été observé pour GR et AP-1, GR et NF- κ B antagonisent l'activité transcriptionnelle l'un de l'autre sur leurs éléments de réponse respectifs. Des expériences de retardement sur gel ont démontré que GR bloque la liaison de NF- κ B sur son élément de réponse et il interagit directement avec la sous-unité Rel A de NF- κ B via son DBD (Fig. 1.10A) (Scheinman et al., 1995b; Caldenhoven et al., 1995) (De Bosscher et al., 1997; McKay and Cidlowski, 1998). Les coactivateurs CBP et SRC-1 sont également impliqués dans la régulation de l'activité NF- κ B par les Gc. En effet, la séquestration de CBP et SRC-1 par l'un ou l'autre des facteurs de transcription est responsable, du moins en partie, de la diminution de l'expression des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire par les Gc (Sheppard et al., 1998) (Fig. 1.10B). Une étude récente suggère que CBP est essentiel pour médier l'antagonisme transcriptionnelle entre NF- κ B et GR, mais CBP agirait plutôt comme un intégrateur qui stabilise l'interaction entre GR et NF- κ B plutôt que d'être un cofacteur qui est utilisé indépendamment par l'un ou l'autre des facteurs de transcription (McKay and Cidlowski, 2000) (Fig. 1.10C). Une autre étude suggère que CBP et SRC-1 ne jouent pas de rôle primordial dans l'antagonisme transcriptionnelle entre NF- κ B et GR, mais plutôt que l'interaction de ces deux facteurs au niveau d'un élément de réponse à NF- κ B interfère avec la machinerie de transcription de base (De Bosscher et al., 2000). Récemment, un nouveau mécanisme d'action de GR/Gc à été identifié dans la régulation de la transcription du gène codant pour IL-8 et ICAM-1. Traiter des cellules de carcinome de

poumon humain (A549) avec le $TNF\alpha$ induit l'expression de NF- κ B qui va lier son élément de réponse et induire l'assemblage du complexe de pré-initiation. Lorsque ces mêmes cellules sont traitées avec de la Dex, GR est transloqué au noyau et lie NF- κ B sur son élément de réponse. GR empêche la phosphorylation d'un résidu sérine en position 2 du domaine C-terminal de l'ARN pol II, probablement en recrutant un corépresseur qui aurait une activité phosphatase spécifique à la serine-2 ou une activité inhibitrice de kinase spécifique à la sérine 2 (Fig. 1.10 D) (Nissen and Yamamoto, 2000). Rappelons que la phosphorylation du CTD est essentielle pour faire passer l'ARN pol II d'un état latent à un état actif (Koleske and Young, 1995; Steinmetz, 1997). Finalement, les Gc inhibent l'activité transcriptionnelle de NF- κ B en induisant la synthèse de la protéine inhibitrice I κ B qui séquestre NF- κ B dans un complexe cytoplasmique inactif (Fig. 1.10E) (Auphan et al., 1995; Scheinman et al., 1995b). Il semble que l'augmentation de l'expression de I κ B par GR et la répression de l'activité de NF- κ B par GR sont deux processus biochimiques séparables l'un de l'autre (Heck et al., 1997).

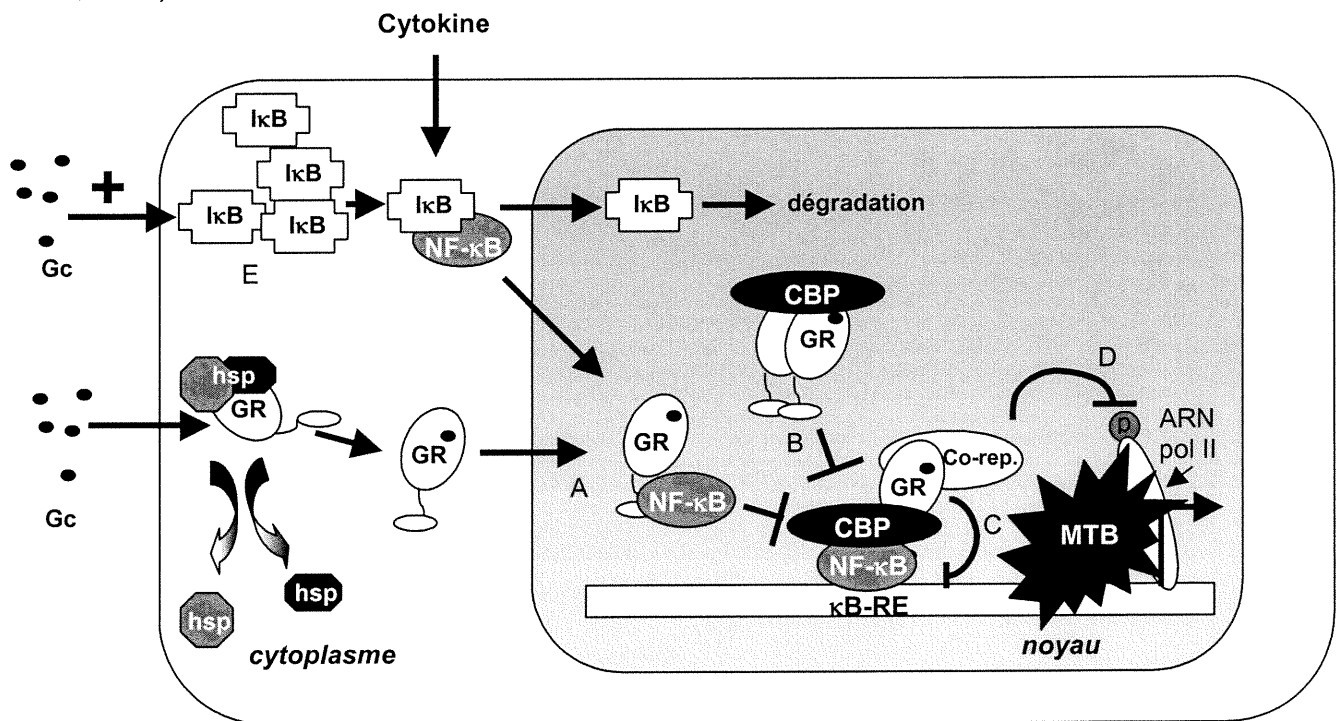


Figure 1.10 Régulation de l'activité NF- κ B par les glucocorticoïdes. A) Interaction directe entre GR et NF- κ B. B) Séquestration d'un coactivateur commun à GR et NF- κ B. C) CBP agit comme un intégrateur qui stabilise l'interaction entre GR et NF- κ B et GR interfère avec l'activité transcriptionnelle de NF- κ B. D) GR recrute un corépresseur au site de liaison de NF- κ B et bloque la phosphorylation de la sérine 2 du domaine CTD de l'ARN pol II. E) Les glucocorticoïdes (Gc) inhibent l'activité transcriptionnelle de NF- κ B en induisant la synthèse de la protéine inhibitrice I κ B.

1.3.5.6.3. Les Glucocorticoïdes participent dans la différenciation des cellules T

L'apoptose des cellules T peut être initiée par différents signaux. Ceci peut être causé par l'activation de Fas/CDp5/Apo1, des radiations, le TNF-I, le stress oxydatif, les dommages causés à l'ADN, l'induction du TCR dans les cellules T immatures ou l'exposition des cellules T aux Gc (Ramdas and Harmon, 1998). Plusieurs indices ont amené les groupes de recherche à se concentrer sur l'apoptose induite par les Gc. En effet, l'insuffisance surrénalienne ainsi qu'une surrénalectomie résulte en une hypertrophie du thymus. L'administration d'ACTH chez de telles souris entraîne une réduction marquée des nodules dans le thymus. Enfin, des corticostéroïdes synthétiques induisent une régression des lymphosarcomes. Les cellules lymphoïdes et tout particulièrement les cellules T double positives CD4+ et CD8+ sont parmi les quelques types cellulaires qui entrent en apoptose en réponse aux corticostéroïdes (Ashwell et al., 2000). Les Gc induisent l'apoptose des thymocytes via la voie de signalisation mitochondriale. Il semble que dans certains cas, les Gc induisent l'expression de gènes qui vont causer la mort cellulaire de façon directe ou indirecte (Thomas et al., 1983) (Cohen and Duke, 1984). Ceci a été confirmé par des expériences plus physiologiques. En utilisant un mutant de GR qui ne peut plus activer la transcription de nouveaux gènes mais qui peut toujours interagir avec différents facteurs, il a été possible de démontrer que les thymocytes de ces animaux sont réfractaires à l'apoptose induite par les Gc (Reichardt et al., 1998). GR induit la mort cellulaire programmée des cellules T afin d'éliminer les cellules T ou les thymocytes qui se différencient de façon anormale (Wyllie, 1980) (Cohen and Duke, 1984; Baxter et al., 1971; Lippman et al., 1973; Zacharchuk et al., 1990). La réponse apoptotique des cellules T induite par le TCR est antagonisée par les Gc (King et al., 1995; King et al., 1994; Zacharchuk et al., 1990; Iwata et al., 1991). Ainsi, l'administration simultanée de deux signaux létaux, soit l'activation de l'apoptose induite par le TCR et les Gc ne causent pas la mort cellulaire. L'activation de l'apoptose induite par le TCR induit une surexpression du ligand Fas (FasL) et sa liaison subséquente à Fas. GR prévient la surexpression de FasL. Différents facteurs ont été identifiés comme essentiels pour bloquer la surexpression de FasL par GR: GILZ (Gc-induced leucine zipper), NF-AT, Egr-2, Egr-3, NF- κ B (Ashwell et al., 2000). Un autre facteur a récemment été identifié comme cible pour l'action de GR/Gc dans les cellule T. L'induction de Nur77 est

essentielle pour observer l'apoptose induite par le TCR (Décrit plus en détail à la section 1.3.5.4.1). Des souris transgéniques exprimant un dominant négatif de Nur77 arborent un phénotype où le processus apoptotique accompagnant la sélection négative des thymocytes est inhibé (Cheng et al., 1997). Notre groupe a démontré que l'activité Nur77 sur le NurRE est activée par le TCR et que cette activation est antagonisée par la dexaméthasone, un analogue des Gc (Philips et al., 1997b). Nur77 est impliqué dans la surexpression de FasL. Toutefois, aucun élément de réponse à Nur77 n'a été observé dans les séquences promotrices de FasL (Weih et al., 1996) et d'autre part, une autre étude démontre que Nur77 et NOR-1 exercent des fonctions redondantes dans l'apoptose des cellules T indépendamment de la voie Fas (Cheng et al., 1997).

1.3.5.6.4. Les glucocorticoïdes répriment l'axe Hypothalamo-hypophyso-surrénalien

1.3.5.6.4.1. Répression de la transcription de la POMC par les glucocorticoïdes

Différentes études ont montré que la sécrétion de l'ACTH ainsi que l'expression de la POMC sont réprimées par les Gc au niveau du lobe antérieur de l'hypophyse (Birnberg et al., 1983). À l'aide de souris transgéniques, il a été possible de démontrer qu'une séquence promotrice de 480 pb est suffisante pour l'expression tissu-spécifique de la POMC et que cette région est essentielle pour observer la régulation appropriée de l'expression du gène de la POMC par les Gc (Tremblay et al., 1988). Des études plus détaillées du promoteur ont révélé la présence d'une séquence spécifique à GR, le nGRE (-57 à -72), dans la région proximale du promoteur (Fig. 1.7) (Drouin et al., 1989). Cette séquence a la particularité de lier 3 molécules de GR. Un homodimère de GR lie le nGRE, et ensuite il y a liaison d'un monomère de GR du côté opposé de la double hélice (Drouin et al., 1993). Malgré la haute affinité qu'a ce nouveau complexe de trimère de GR pour le nGRE, le nGRE n'est pas suffisant en lui-même pour conférer une réponse hormonale complète. Ainsi, d'autres éléments du promoteur semblent être importants pour médier la répression de la transcription du gène de la POMC par les Gc (Drouin et al., 1993). À l'aide de délétions du promoteur de la POMC, une région comprise entre -480 et -320 a été identifiée comme étant importante pour l'effet des Gc (Riegel et al., 1991). Récemment, une séquence localisée dans ce domaine a été identifiée, le NurRE (-383 à -405) (Fig. 1.7). Cet élément de réponse est essentiel pour observer l'effet du CRH et l'effet des Gc. Le NurRE a été identifié comme étant une séquence qui lie des homo- ou des hétérodimères de facteurs Nur. GR quant à lui ne lie

pas cet élément de réponse (Philips et al., 1997b). De plus cet élément de réponse est parfaitement conservé entre le rat et la souris, alors que le NurRE présent dans le promoteur humain contient seulement un nucléotide différent (Fig. 1.7) Les Gc répriment l'activité de base du promoteur via le NurRE ainsi que l'activité induite par le CRH toujours via le NurRE (Philips et al., 1997b). GR antagonise l'activité transcriptionnelle de Nur77 probablement par un mécanisme qui implique une interaction protéine/protéine directe ou indirecte, et ce, de façon similaire à l'antagonisme transcriptionnel observé entre GR et AP-1 et/ou GR et NF- κ B. Cet antagonisme transcriptionnel entre GR et Nur77 est observé par un autre groupe, mais au niveau du nGRE/NBRE (Murphy and Conneely, 1997).

1.3.5.6.4.2. Répression de la transcription du CRH par les glucocorticoïdes

L'expression du CRH est également sous contrôle négatif par les Gc (Adler et al., 1988). Ce contrôle négatif se fait autant au niveau de la sécrétion qu'au niveau de la transcription. Les Gc bloquent les stimuli qui induisent la sécrétion du CRH (Grossman, 1995). Différentes cibles d'action pour les Gc ont été découvertes dans le promoteur du CRH. Une séquence nGRE qui lie GR avec grande affinité est présente entre les résidus -278 à -249 (Malkoski et al., 1997). Ce nGRE est adjacent à un site AP-1 et il semble que l'effet des Gc est dû à une compétition entre GR et AP-1 pour la liaison à l'ADN (Malkoski and Dorin, 1999). D'autres études suggèrent que les sites de liaison à GR dans le promoteur du CRH ne soient pas suffisants pour médier la répression de la transcription du gène codant pour le CRH par les Gc. Les Gc/GR exerceraient leur action via un élément de réponse à l'AMPc (CRE) probablement en interagissant de façon directe ou indirecte avec CREB (Guardiola-Diaz et al., 1996). Enfin, un élément de réponse au facteur Nur a été localisé entre les résidus -352 et -332 dans le promoteur du CRH (Murphy et al., 1996). Nur1 active très fortement la transcription du CRH via cet élément de réponse (Murphy and Conneely, 1997). On peut imaginer que GR pourrait exercer son action sur cet élément de réponse en antagonisant l'activité transcriptionnelle des facteurs Nur. Enfin, les Gc répriment l'activité du CRH en agissant aussi comme répresseur de l'expression du récepteur du CRH au niveau des cellules corticotrophes (Iredale and Duman, 1997).

Ainsi, les Gc répriment l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien à différents niveaux pour maintenir l'homéostasie de l'organisme en réponse au stress. Toutefois, les études sont très divergentes quant à savoir quels mécanismes sont impliqués dans

la répression de la transcription de la POMC et du CRH. Un groupe de recherche a mis au point des souris dans lesquelles GR de type sauvage a été remplacé par GR contenant une mutation ponctuelle dans la boîte D de son deuxième doigt de zinc, les souris ($Gr^{dim/dim}$) (Reichardt et al., 1998). Cette mutation ponctuelle (A458T) (Fig. 1.5) empêche l'homodimérisation de GR et par le fait même, sa capacité de lier des éléments de réponse et d'activer ou réprimer la transcription des gènes par un mécanisme qui implique la liaison de GR à l'ADN en dimère. Toutefois, ce mutant de GR peut interagir avec d'autres facteurs de transcription car la dimérisation de GR n'est pas essentielle pour que GR interagisse avec AP-1 (Heck et al., 1994). Ce système s'est avéré très intéressant pour déterminer les mécanismes impliqués dans la régulation de l'axe HHS par les Gc. Les différences observées entre les souris dont le gène codant pour GR a été complètement inactivé et ces souris $Gr^{dim/dim}$ ont été répertoriées dans la table 1.2.

Fonction	$GR^{-/-}$	$GR^{dim/dim}$
Expression du CRH	expression augmentée dans le NPV jour E16.5 : 50% adulte : 2 fois plus	Aucun changement
Expression de la POMC Lobe Antérieur	E14.5 : identique E16.5 : ARNm + élevé	Adulte : ARNm + élevé
Lobe Neuro-intermédiaire	E18.5 : ARNm + élevé Adulte : ARNm+ élevé (72%) E16.5 : ARNm – élevé (30%)	Aucun changement
Accumulation de l'ACTH Lobe antérieur : Niveau plasmatique :	20 fois plus élevé	augmentation de 2.2 fois pas de changement
Structure des surrénales	Désorganisation de la médulla	Morphologie normale

Table 1.2. Importance de la dimérisation de GR dans l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien

L'expression du CRH dans les souris $Gr^{dim/dim}$ ne change pas comparativement aux souris sauvages. Ainsi la répression de la transcription du CRH impliquerait une interaction protéine/protéine possiblement entre GR et CREB et/ou Nurr1 plutôt que la dimérisation de GR et sa liaison subséquente à l'ADN (Guardiola-Diaz et al., 1996; Murphy and Conneely, 1997). La répression de la POMC par les Gc semble requérir l'activité de liaison à l'ADN de GR. En effet, la liaison de GR au nGRE pourrait être

essentielle pour réprimer l'activité transcriptionnelle de base de la POMC. Chez les souris^{dim/dim} le niveau de CRH est normal ce qui signifie que la transcription de POMC n'est pas induite par les facteurs Nur. Par contre, il est possible qu'un antagonisme transcriptionnel entre GR et Nur soit essentiel pour réprimer l'expression de la POMC dans un état où la transcription de la POMC est activée. Il est important de noter que les niveaux d'ACTH plasmatique chez les souris^{dim/dim} sont normaux comparativement aux souris GR^{-/-}. Cette différence peut être attribuée au fait que l'expression du CRH dans les souris^{dim/dim} est contrôlée de façon adéquate, n'activant pas de façon constitutive l'axe HHS, mais ceci peut également suggérer qu'un autre mécanisme puisse entrer en jeu pour réprimer la transcription de la POMC. Enfin plusieurs résultats expérimentaux démontrent que des régions plus distales dans le promoteur de la POMC sont essentielles pour la répression par les Gc suggèrent que l'antagonisme transcriptionnel entre Nur77 et GR joue un rôle important dans la répression de la POMC, et possiblement dans la répression de la transcription du CRH.

1.4.DESCRPTION DU PROJET

Le sujet de cette recherche consiste à étudier les mécanismes sous-jacents à l'antagonisme transcriptionnel entre Nur77 et GR. La première étude démontre que Nur77 et GR interagissent directement ensemble par leur domaine de liaison à l'ADN *in vitro* et *in vivo*. L'interaction *in vivo* a été démontrée par co-immunoprécipitation des protéines endogènes dans un modèle de cellules corticotrophes, les AtT-20.

La seconde étude démontre que les coactivateurs de la famille p160 et que CBP stimulent l'activité transcriptionnel des facteurs Nur. La formation de dimères de facteurs Nur semble favoriser cette activation par les coactivateurs. Il restera à déterminer si CBP et les SRC jouent un rôle dans l'antagonisme transcriptionnel entre Nur77 et GR comme cela a été démontré pour l'antagonisme transcriptionnel entre GR et AP-1 et GR et NF- κ B.

2.ARTICLE 1

PROTEIN/PROTEIN INTERACTIONS AND TRANSCRIPTIONAL ANTAGONISM
BETWEEN THE SUBFAMILY OF NGFI-B/Nur77 ORPHAN NUCLEAR RECEPTORS
AND GLUCOCORTICOID RECEPTOR

Christine Martens, Mario Maira, Steve Bilodeau, Yves Gauthier, Jacques Drouin*

Submitted to Molecular Endocrinology on novembre 9 2001

Laboratoire de génétique moléculaire
Institut de recherches cliniques de Montréal
110 des Pins Ouest
Montréal Québec
Canada H2W 1R7

***Corresponding author:** Dr Jacques Drouin
Laboratoire de génétique moléculaire
Institut de recherches cliniques de Montréal
110 des Pins Ouest
Montréal QUÉBEC Canada H2W 1R7
Tel: 514-987-5680
Fax: 514-987-5575
drouinj@ircm.qc.ca

2.1.ABSTRACT

Glucocorticoids (Gc) act through the Glucocorticoid Receptor (GR) to enhance or repress transcription of glucocorticoid responsive genes depending on the promoter and cellular context. Repression of POMC gene expression by Gc was proposed to use different mechanisms. First, POMC repression was suggested to involve binding of three GR molecules to the nGRE located in the proximal region of POMC promoter. Recently, we described the NurRE as a target for Gc antagonism. NGFI-B (Nur77), an orphan nuclear receptor, and two related factors, Nurr1 and NOR1, bind the NurRE as homo- or heterodimers to enhance POMC gene expression in response to CRH. Gc antagonize NGFI-B-dependent transcription. We now show that GR antagonizes NurRE-dependent transcription induced by all members of the Nur77 subfamily and that these nuclear receptors can all interact directly with GR. Moreover, transcriptional antagonism as well as direct protein:protein interaction between NGFI-B and GR take place via their respective DNA binding domains, although DNA binding itself and the GR homodimerization interface are not involved. In contrast to its inability to repress AP-1 or NF- κ B-dependent transcription, GR mutant K461A is active for trans-repression of Nur-dependent transcription. Our data suggest a mechanism for antagonism between two nuclear receptors, GR and Nur77, that is unique, although related in general principles to that proposed for antagonism between GR and AP-1, and between GR and NF- κ B.

2.2.INTRODUCTION

Glucocorticoids mediate their effects by binding to the intracellular glucocorticoid receptor (GR), which, like other members of the steroid/thyroid hormone receptor superfamily, functions as a ligand-activated transcriptional regulator. GR can enhance gene transcription by binding with high affinity to the Gc response element (GRE) as a homodimer and by contacting the basal transcription machinery, co-activators and other transcription factors (1;2). This process is fairly well understood but the mechanisms for transcriptional repression by GR are not as clearly defined. GR can repress gene expression either by binding to negative response elements (nGRE) or indirectly via protein:protein interaction (2). The best examples of the latter were described for the control of the inflammatory response. Indeed, the response to inflammation is partly mediated through activation of the transcription factors AP-1 and NF- κ B/Rel (3;4). The activation of AP-1 and NF- κ B target genes is repressed by Gc via a mechanism that may involve physical interaction between GR DNA binding domain (DBD) and AP-1 or RelA (5-11). Alternatively or in addition, these factors may antagonize each other's action by sequestration of a common target like CBP/p300 (12) although the implication of CBP itself is controversial (13).

The hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis is another system where repression of transcription by Gc serves an essential function. In this case, Gc (and GR) provide a negative feedback loop following activation of the axis, for example in response to stress. Activation of the HPA axis starts with the secretion of hypothalamic corticotrophin releasing hormone (CRH), the activation of pituitary pro-opiomelanocortin (POMC) gene transcription and adrenocorticotrophic hormone (ACTH) secretion in response to CRH, resulting in ACTH-induced stimulation of adrenal Gc synthesis. At the hypothalamic level, Gc represses CRH gene transcription (14;15) and CRH secretion (16), and similarly in the anterior pituitary, Gc repress POMC transcription (15;17-19) as well as ACTH secretion (16). Different mechanisms have been proposed for Gc repression of POMC transcription. We have previously localized a nGRE in the proximal region of the POMC gene promoter (19;20). The action of the nGRE appeared to be promoter context dependent (19) and required the cooperative binding of three GR molecules (20). Repression through the nGRE would thus be impaired with a GR mutation that prevents dimerization. Such GR mutation was introduced in mice by targeted gene replacement (knock-in) and it was found to hamper pituitary, but not hypothalamic, Gc feedback (21). Thus, within the specific context of these mice, the

nGRE is a likely target to account for deficiency of dimerization-dependent GR repression. However, Gc repression of POMC transcription may also involve other promoter targets (22), in particular promoter targets that are dependent on cell-specific promoter recognition. We have identified such target in the distal POMC promoter (23). This novel target, the NurRE (Nur Response Element), is a binding site for dimers of Nur77 (NGFI-B) but it is not a GR binding site (24). We have proposed that GR antagonism of NurRE-dependent transcription occurs through protein:protein interactions, although the precise nature of this putative interaction remained to be defined. Nur77, also known as NGFI-B for Nerve Growth Factor-inducible (25;26), differs from other orphan nuclear receptors because it was the first nuclear receptor found to be active on transcription as a monomer (27). The binding site for Nur77 monomers is the NBRE (27;28) but in contrast, the much more potent NurRE bound by Nur77 dimers is a palindrome of two NBRE sequences separated by 6 bp (24;29). There are two nuclear receptors related to Nur77, Nurr1 (Nur-related 1) (30) and NOR-1 (31). All three are very similar in the zinc finger DNA binding domain; they are relatively conserved in the putative ligand binding domain and less so in the N-terminus (32). Nur factors have been implicated at all levels of the HPA axis. Nur77 mRNA is rapidly induced in the paraventricular nucleus by stress stimuli (33), which constitute important regulators of hypothalamic CRH. Nur factors are expressed in the anterior pituitary (34) and Nur77, Nurr1 and NOR-1 mRNAs are increased in the pituitary tumor cell line AtT-20 after treatment with CRH (29;35). Moreover, Nur77 and Nurr1 transcripts are strongly induced by stress in the adrenal cortex (36) and Nur77 is implicated in regulation of the steroidogenic enzyme steroid-21 α -hydroxylase (28).

In the pituitary, we have demonstrated that signals elicited by CRH act on the NurRE for activation of POMC transcription. Gc antagonize the Nur77-dependent transcriptional activation of POMC synthesis. We now show that the other Nur transcription factors, Nurr1 and NOR-1, are also subject to antagonism by GR and that this antagonism appears to involve direct protein:protein interactions between the DBDs of GR and Nur factors. However, the GR/Nur interaction does not appear to involve the same GR DBD residues as those required for GR homodimerization.

2.3.MATERIALS AND METHOD

2.3.1.PLASMIDS

The NurRE trimer reporter was constructed in pXP1-luc (37) containing the minimal (-34 to +63) POMC promoter as described previously (29). The GRE dimer was previously described (20). NGFI-B, Nurr1 and NOR-1 plasmids were described previously (29). Δ N1 NGFI-B mutant is an internal deletion between aa D₃-P₂₁₄, Δ N2 is a deletion between L₃-L₁₇₄, the Δ C mutant ends at aa 380, Δ DBD/NGFI-B is an internal deletion within two Sma1 restriction sites. Δ C Nurr1 mutant is a C-terminal deletion at aa 352 and Δ N1 is an internal deletion between aa 72 and aa 162. An oligonucleotide flag (5'-gactacaaggacgacgatgacaag-3') was synthesized for insertion at the N-terminal region of NGFI-B and Nurr1. The flag-NGFI-B/DBD start at T₂₁₆ and ends at K₃₆₂ and the flag-Nurr1/ DBD start at Q₂₄₇ and ends at G₃₉₇. In both cases, the flag is inserted in N-terminal. *In vitro* translated GR protein was produced using plasmid rBal117 (38). GST-GR(DBD) was graciously provided by M. Michalak (39). GRD4X and GRA458T mutants were described (40) and provided by A. Cato. GR K461A was described (41) and provided by K. Yamamoto. Vectors for the two-hybrid system were described previously (42) except for the VP16/GR₁₋₅₁₃, which was cloned at the Eco RV site of pCMX-VP16.

2.3.2.CELL CULTURE AND TRANSFECTION

African green monkey kidney fibroblast-like CV-1 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% of bovine fetal serum and maintained at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂. CV-1 cells were plated in 12-well plates at a density of 50 000 cells per well the evening prior to transfection and then transfected by the calcium phosphate coprecipitation method. The next day cells were rinsed with PBS and fed with DMEM-10% FBS containing either vehicle or dexamethasone 10⁻⁷M for 24 h. Results show a representative experiment that was repeated 3 to 5 times, except for Figures 2C and 3C where results are presented as the means \pm s.e.m., n=6. Plasmids CMV- β Gal or RSV-GH were used as internal control for transfection efficiency.

2.3.3.RECOMBINANT PROTEIN PRODUCTION AND PULL-DOWN ASSAYS

The GR/DBD-glutathione-S transferase (GST) and the GST fusion proteins were produced as described (39). ³⁵S-labeled *in vitro* synthesized NGFI-B, Nurr1, NOR-1 and Luciferase as well as NGFI-B and Nurr1 mutants were obtained by using the TNT coupled reticulocyte lysate system (Promega). Protein-protein interaction assays (29;43) were performed with 500 ng of GST protein or 500 ng of fusion protein coupled to glutathione beads (Pharmacia) and about 50 ng of ³⁵S-labeled protein in the binding

buffer (NaCl 150 mM, Tris pH 8 10mM, 0.3% Chaps, DTT 1mM, ZnCl₂ 10 μM and NaN₃ 1mM) for 4 hour at 4°C.

2.3.4. AT-20 NUCLEAR EXTRACTS AND COIMMUNOPRECIPITATION

AtT-20 D16V cells were grown under the same condition as CV-1 cells. AtT-20 cells were plated in 150 mm dishes at a density of 6 000 000 cells per dish 36 h prior to treatment with vehicle or dexamethasone 10⁻⁷M and CRH 10⁻⁷M for 3 h. Cells were washed twice with cold PBS and harvested in PBS containing 1mM EDTA. The cells were then centrifuged and resuspended in 800 μl of buffer A (Tris pH7.9 10mM, KCl 10mM, EDTA 0.1mM, EGTA 0.1 mM, PMSF 0.1mM, aprotinin 1 μg/ml, leupeptin 1 μg/ml and pepstatin 1 μg/ml). Cells were allowed to swell on ice for 15 min before addition of 50 μl NP-40 10% followed by vigorous vortexing. After centrifugation, the nuclear pellet was resuspended in 50 μl of buffer C (20mM Tris pH 7.9, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10⁻⁷M Dex and the same protease inhibitor cocktail that was in buffer A) and shaken vigorously at 4°C for 1 h. The protein concentration of the nuclear extract was estimated by the Bradford assay. Coimmunoprecipitation was performed using 100 μg AtT-20 nuclear extract which was precleared with 4 μg of purified rabbit immunoglobulin G (IgG, Sigma). 100 ng Nur77 antibody (N19; SantaCruz Biotechnology) was used for immunoprecipitation. GR was revealed by Western blotting with a GR antibody (GR P-20; SantaCruz Biotechnology) and an anti-rabbit antibody-horseradish peroxidase conjugate (Sigma). Revelation was performed by chemiluminescence as described by the manufacturer (ECL+plus; Amersham Pharmacia).

2.3.5. PROTEIN OVEREXPRESSION AND ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAYS

CV-1 cells were plated at 1 000 000 cells per 100 mm dish 16 hours prior to transfection and then transfected the next day by the calcium phosphate coprecipitation method using 10 μg expression vector; total amount of DNA was completed to 20 μg with pSP64. The next day, dishes were rinsed twice with PBS and harvested for nuclear extract preparation as for than AtT-20 cells nuclear extract. Flag proteins were detected by Western blot (antibody M5, Sigma) and an anti-mice horseradish conjugate (Sigma). Revelation was performed by chemiluminescence as above. Cos-1 cells were grown under the same conditions as CV-1 and AtT-20 cells. Cells were plated at a density of 1 000 000 cells per dish of 100 mm 16 hours prior transfection by the calcium phosphate coprecipitation method with 10 μg of expression vector and we completed total amount

of DNA to 20 μg with pSP64. Cells were washed twice with cold PBS and harvested in PBS containing 1mM EDTA. The cells were then centrifuged and resuspended in 400 μl of buffer A (Tris pH7.9 10mM, KCl 10mM, EDTA 0.1mM, EGTA 0.1 mM, PMSF 0.1mM, aprotinin 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, leupeptin 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and pepstatin 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Cells were allowed to swell on ice for 15 min before addition of 50 μl of NP-40 10% followed by vigorous vortexing. After centrifugation, the nuclear pellet was resuspended in 50 μl buffer C (20mM Tris pH 7.9, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA and the same protease inhibitor cocktail as in buffer A) and shaken vigorously at 4°C for 1 hour. The protein concentration of the nuclear extract was estimated by the Bradford assay. 5 μg nuclear extract were used for gel shift experiments as previously described (29).

2.4.RESULTS

2.4.1.DIRECT PROTEIN-PROTEIN INTERACTION BETWEEN NUR FACTORS AND GR

We had previously demonstrated that Gc/GR antagonize Nur77-dependent transcriptional activity (23). The other Nur factors are quite homologous (Fig. 2.1A) and in many systems, more than one Nur factor is induced by the same signals (29;42;44-47). In order to determine whether all three Nur factors can be antagonized by Gc, we used a NurRE reporter in cotransfection experiments to test the ability of Gc to inhibit the transcriptional activity of each Nur factor (Fig. 2.1B). In presence of dexamethasone (Dex), GR antagonized the activity of all three Nur factors, albeit with slightly different efficacies. We had previously shown that GR cannot bind the NurRE. We therefore assessed the hypothesis of a direct protein:protein interaction between GR and NGFI-B. We had previously suggested that the GR DBD may be involved in Nur77 antagonism (23). We thus used a resin-bound GST-GR(DBD) fusion protein (39) in an *in vitro* pull-down assay to test for interaction with *in vitro* translated Nurr1, NOR-1 and NGFI-B (Fig. 2.1C) All three Nur factors, but not luciferase, interacted with GST-GR(DBD) but not with GST itself. These results indicate that, at least *in vitro*, Nur factors interact with GR DBD by direct protein:protein interactions.

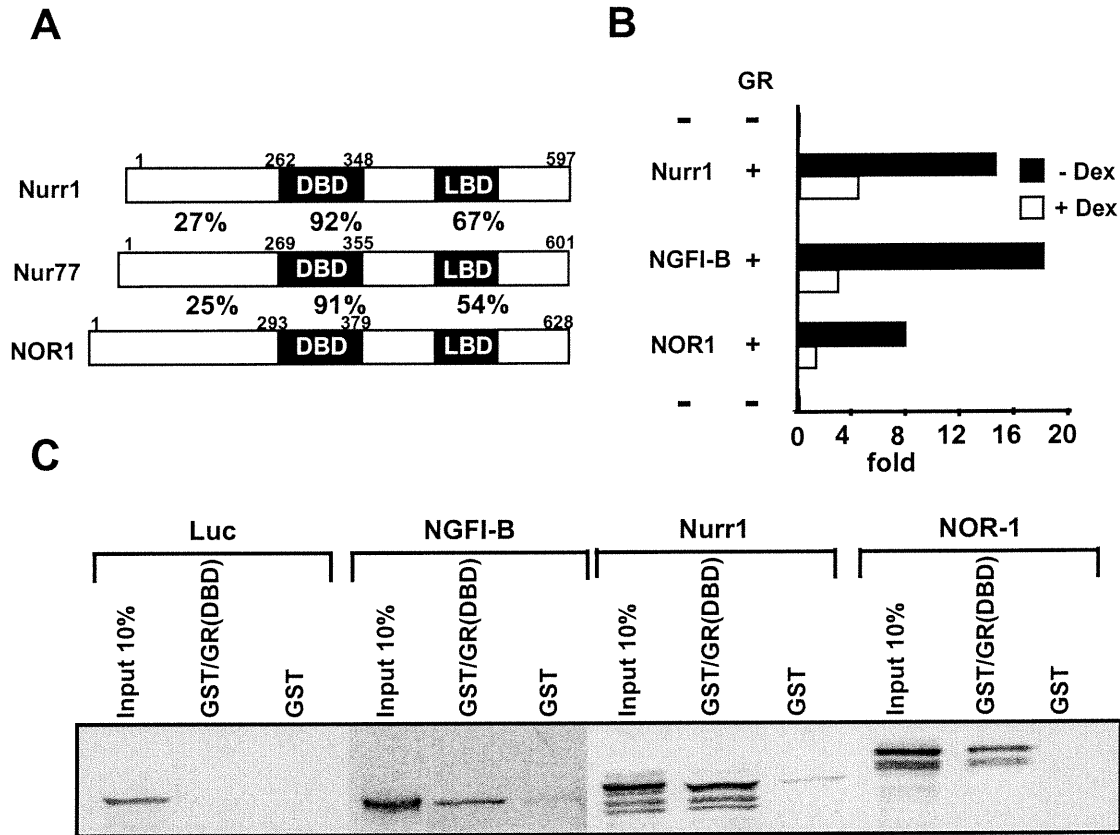


Figure 2.1. Transcriptional antagonism between Nur factors and GR involves direct protein/protein interaction. **A)** Schematic representation of the three known mouse Nur factors and their degrees of homology in the N-terminal, DBD and putative ligand binding domains. Comparisons are relative to mouse Nur77. NGFI-B, the rat homologue of Nur77 is 96,3% identical to Nur77. **B)** Transcriptional antagonism of all three Nur factors by GR. CV-1 cells were cotransfected with expression vectors (50 ng) for Nur factors, GR expression vector (200 ng) and NurRE reporter(750 ng). RSV-GH (100 ng) was used as internal control. **C)** Direct protein/protein interaction between Nur factors and GR DBD. GST/GR(DBD) specifically retains NGFI-B, Nurr1 and NOR-1 in pull-down assays.

2.4.2. NUR FACTORS DOMAINS REQUIRED FOR GR ANTAGONISM AND INTERACTION

Previous analysis of NGFI-B (rat) and Nur77 (mouse) using monomer-dependent NBRE reporter genes had indicated that the N-terminal AF-1 activation domain of these two orthologs were primarily responsible for transcriptional activity (48-50). Using a NurRE-dependent reporter that is bound by Nur factors homo or heterodimers (23;29), we also found that the NGFI-B N-terminal domain accounts for most of its transcriptional activity (Fig. 2.2A). Expression levels of NGFI-B and all its deletion mutants were found to be similar as assessed by gel retardation using Cos-1 cells nuclear extracts overexpressing each mutant proteins (Fig. 2.2D). Next, we mapped the domain of Nur77 required for repression of GR action at the GRE by testing Nur77 mutants (Fig. 2.2 B) for their capacity to repress GR-induced transcription of GRE reporter (Fig. 2.2C). Neither deletion of the N- or C-termini was sufficient to prevent suppression of GR-dependent transcription, although the N-terminal deletion mutants appeared to be slightly less active even at higher concentration of the expression vector (data not shown) than wild-type NGFI-B. The N-terminus of NGFI-B may therefore contribute slightly to the repressor activity which otherwise appears to reside primarily with the DBD. This interpretation is supported by an internal deletion mutant devoid of the DBD. This mutant no longer repressed GR-dependent transcription (Fig. 2.2C). Since it was difficult to assess precisely the level of expression of this deletion mutant, we confirmed this interpretation with a protein that only contains the NGFI-B DBD. A protein flag was added to the DBD to verify its expression and to compare it to the level of full-length flag-NGFI-B expression (Fig. 2.2E). The flagged-DBD was sufficient to repress GR-dependent transcription (Fig. 2.2C). Similar Nurr1 mutants were constructed and assessed for their capacity to activate the NurRE reporter and to repress GR and GRE-dependent transcription (Fig. 2.3). As for NGFI-B, deletion of either C- or N-termini did not impair repression of GR-dependent transcription and a flagged Nurr1 DBD was sufficient for antagonism of GR activity (Fig. 2.3C). Expression levels of Nurr1 mutant proteins was assessed in gel shift experiments (Fig. 2.3D). Next, we wanted to ascertain whether the same NGFI-B and Nurr1 domains are implicated in direct protein:protein interaction with GR as in transcriptional antagonism. We used the *in vitro* pull-down assay (Fig. 2.1) and *in vitro* translated NGFI-B and Nurr1 mutant proteins. All NGFI-B (Fig. 2.4A) and Nurr1 (Fig. 2.4B) mutants bound the GST-GR(DBD) column except for the NGFI-B Δ DBD deletion mutant, in agreement with the

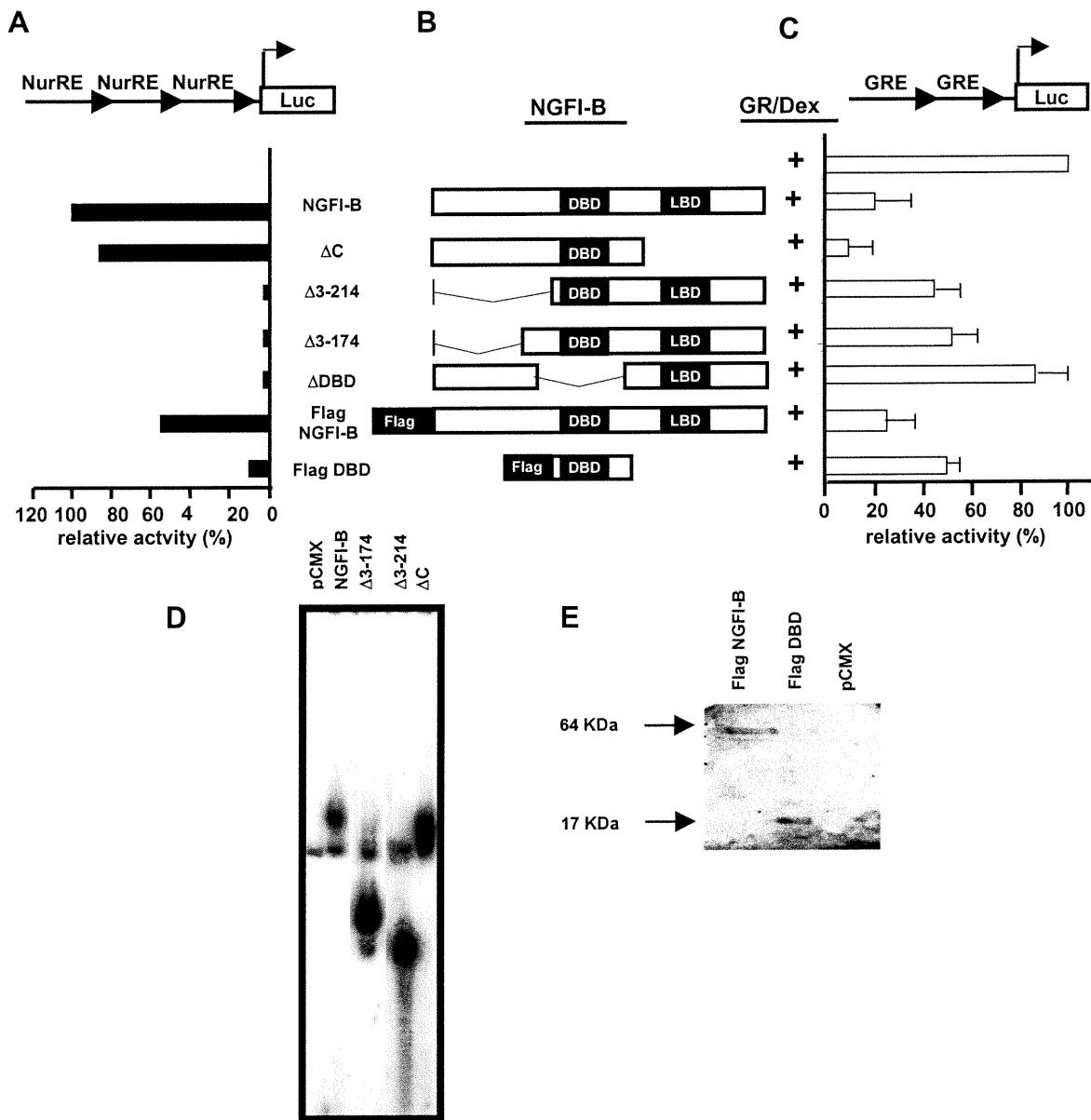


Figure 2.2. The DBD of NGFI-B is sufficient to repress GR-dependent transcription. A) Transcriptional activity of NGFI-B mutants using the NurRE-reporter. CV-1 cells were transfected with expression vectors (10 ng) and NurRE-reporter (750 ng). CMV-βGal (50 ng) was used as internal control and total amount of DNA was completed to 2.5 μg with pSP64. Data are presented as relative activity with NGFI-B wt activity set at 100%. **B)** Schematic representation of NGFI-B mutants. **C)** Antagonism of GR-dependent activity by NGFI-B and its mutants. Data are presented as relative activity and GR transcriptional activity in presence of Dex is set at 100%. **D)** The NGFI-B constructs are expressed at similar levels in nuclear extracts of transfected Cos-1 cells. Levels of wild-type and mutant Nur factors were assessed by gel retardation using NBRE probe. **E)** Both flag constructs are expressed at the same level in nuclear extracts of CV-1 cells. Anti-flag antibody was used to detect expression of flag-NGFI-B and flag-NGFI-B/DBD by Western blot.

model of an interaction mediated through the Nur DBD. Further, the N-terminal deletion mutants bind less efficiently than the intact factors to GR DBD. This difference in *in vitro* interaction may account for the lesser activity of the N-terminal deletion mutants in repression of GR activity. Thus, the N-terminal domain may facilitate the direct interaction between GR and Nur DBDs. Taken together, these findings suggest that the DBD of NGFI-B or Nurr1 is essential for transcriptional antagonism and for direct protein:protein interaction between Nur factors and GR.

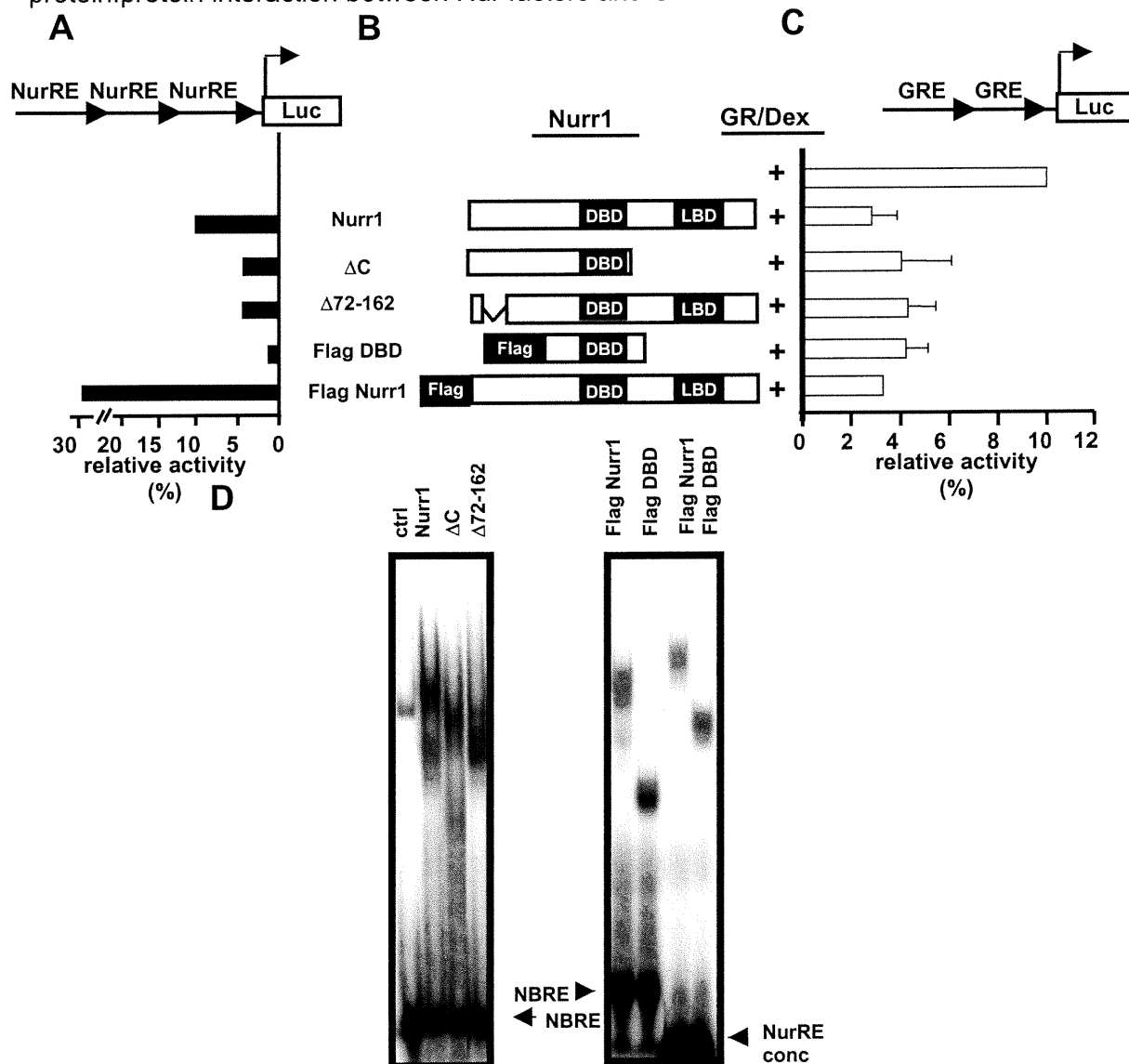


Figure 2.3. The Nurr1 DBD is sufficient to repress GR transcriptional activity. **A)** Transcriptional activity of Nurr1 mutants using the NurRE-reporter. Data are presented as relative activity with Nurr1 wt activity set at 100%. **B)** Schematic representation of Nurr1 mutants. **C)** Nurr1 transcriptional antagonism of GR-dependent activity. Data are presented as relative activity and GR activity in presence of Dex is set at 100%. **D)** The Nurr1 constructs are expressed at similar levels in nuclear extracts of Cos-1 transfected cells. Levels of wild-type and mutant Nur factors were assessed by gel retardation using NBRE and NurRE consensus probes.

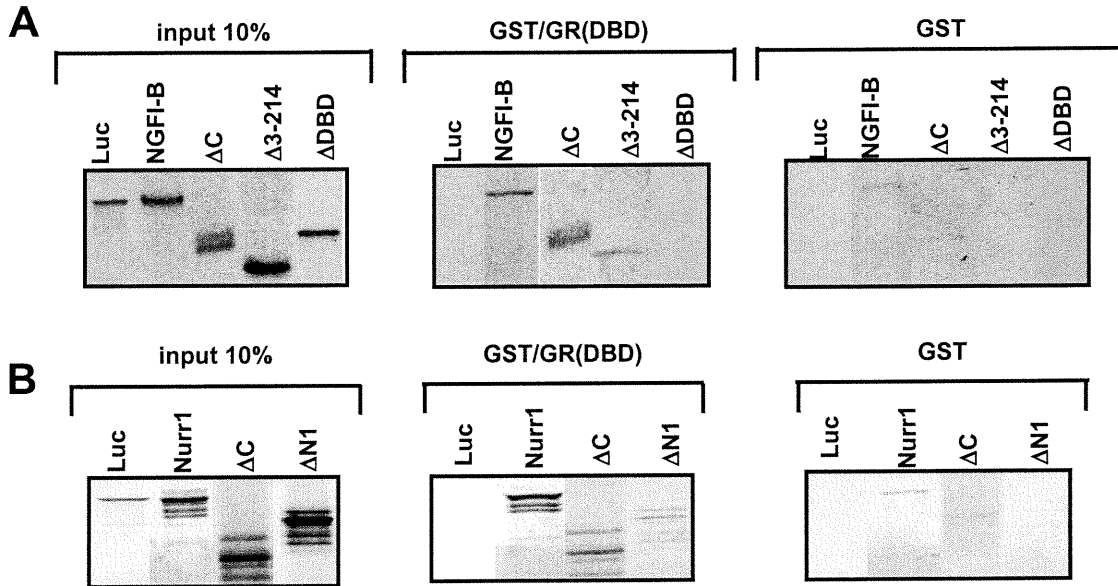


Figure 2.4. Nur77 and Nurr1 domains required for direct interaction with GR(DBD). **A)** Pull-down assay with NGFI-B and deletion mutants. The first panel shows protein input (10%) used for pull-downs. The second panel shows all NGFI-B mutants retained specifically by GST-GR(DBD) but not GST (third panel) except for the DBD-deleted mutant (Δ DBD). **B)** Similar pull-down assay with Nurr1 constructs. C-terminal or N-terminal deletions mutants of Nurr1 interact with GR DBD.

2.4.3. INTERACTION BETWEEN NGFI-B/NUR77 AND GR *IN VIVO*

In order to verify that NGFI-B and GR interact together *in vivo*, we set up a mammalian two-hybrid system. In this system, the activity of a Gal4/DBD-NGFI-B fusion protein was enhanced in the presence of VP16-GR₁₋₅₁₃ (Fig. 2.5A). GR₁₋₅₁₃ is deleted of the LBD and therefore its activity is not ligand dependent. The *in vivo* occurrence of the GR/Nur77 interaction was assessed directly by coimmunoprecipitation using AtT-20 cells nuclear extracts pre-treated or not with Dex and CRH. Nuclear extracts immunoprecipitated with a Nur77 antibody were analyzed by western blotting with a GR antibody (Fig. 2.5B). This experiment showed that GR was immunoprecipitated together with Nur77 from AtT-20 nuclear extracts after treatment with Dex and CRH, but not from extracts of untreated cells. Taken together, these results suggest that Nur77 and GR could interact together *in vivo*, or at least be part of the same complex, and that the signals elicited by CRH and Dex converge on Nur77.

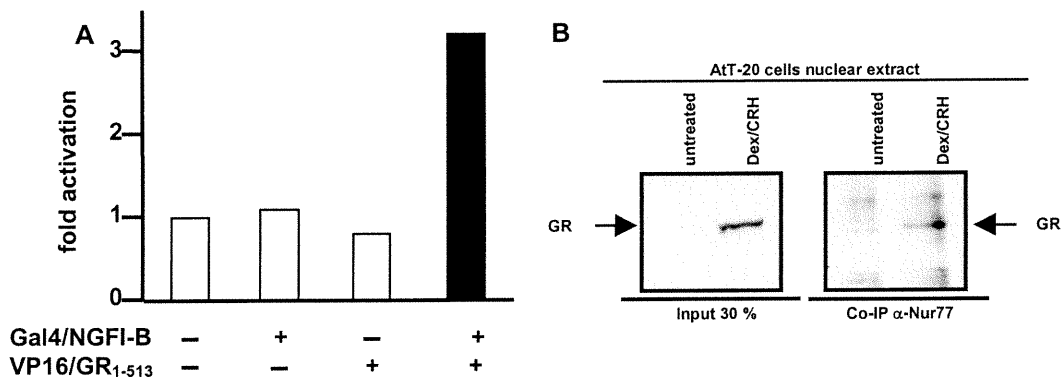


Figure 2.5. Direct interaction between Nur77/NGFI-B and GR *in vivo*. **A)** Two-hybrid assays were performed in AtT-20 cells using expression vectors for fusion proteins Gal4-DBD/NGFI-B and VP16/GR₁₋₅₁₃ as indicated. Cells were cotransfected with a UAS-containing luc reporter plasmid. **B)** Presence of Nur77 and GR in common complexes as revealed by coimmunoprecipitation from nuclear extracts of AtT-20 cells treated with Dex and CRH but not from untreated cells. An anti-Nur77 antibody was used for immunoprecipitation and anti-GR was used for analysis by Western blotting.

2.4.4. NGFI-B/GR TRANSCRIPTIONAL ANTAGONISM IS INDEPENDENT OF GR HOMODIMERIZATION INTERFACE.

Since GR can form homodimers that involve an interface within its DBD, we investigated whether this interface could also be involved in the interaction with NGFI-B. This interface was revealed by crystallography (51;52) and defined functionally with mutations that prevent dimerization (40). Two mutants were used: a single amino acid change of alanine to threonine GRA458T or together with changes of three out of five positions in the D-loop GR(D4X) (Fig. 2.6A). The GRA458T mutation was used in gene knock-in experiments to show the importance of GR dimerization and DNA binding for different GR functions (21). In transrepression experiments using NGFI-B and the NurRE reporter, both mutants were able to transrepress as efficiently as wild-type GR (Fig. 2.6B). These findings suggest that the interaction/antagonism between NGFI-B and GR does not take place via the same protein interface as GR homodimers.

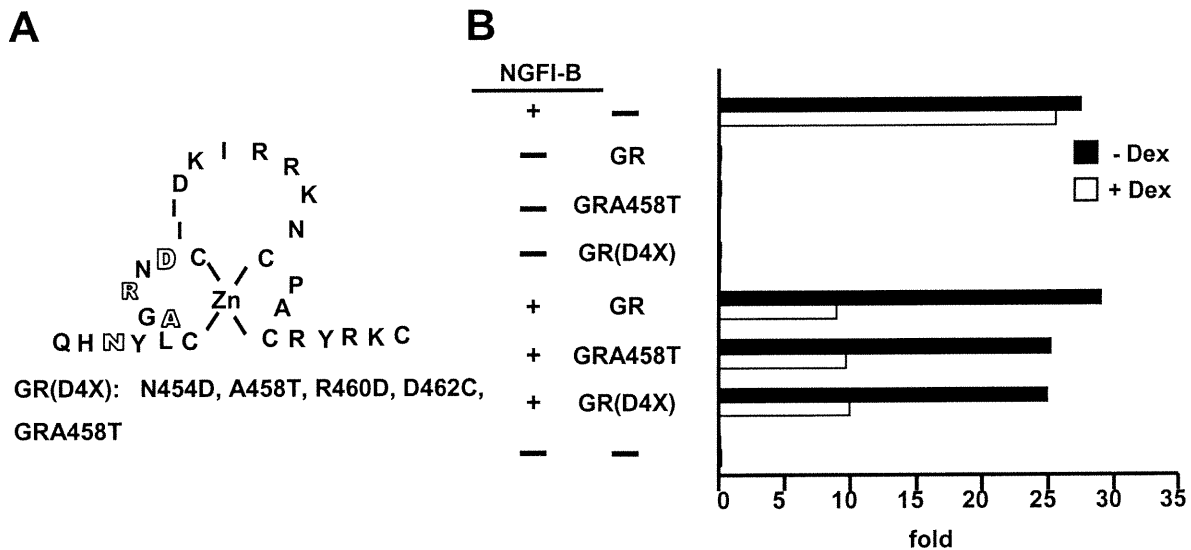


Figure 2.6. GR dimerization is not required for antagonism of NGFI-B-dependent activity. **A)** Schematic representation of human GR second zinc finger showing mutated residues within the D-loop for mutants GRD4X and GRA458T. These mutant proteins are unable to form GR homodimers. **B)** CV-1 cells were cotransfected with NurRE-reporter and NGFI-B (100 ng) expression plasmids and/or GR, GRD4X or GRA458T (800 ng). RSV-GH was used as an internal control. The two GR mutants repressed NGFI-B activity as well as wild type GR.

2.5.DISCUSSION

The repressor activity of GR is an essential feature of its anti-inflammatory activity. It was shown that GR exerts its repressor activity through antagonism of positively acting transcription factors such as NF- κ B and AP-1 (2;3,4). We have recently shown that GR antagonizes transcription elicited by immediate early response genes of the nuclear receptor family. Indeed transcription elicited by NGFI-B (Nur77) is antagonized by GR. The mechanism of this antagonism appears to be quite similar to the antagonism between GR and NF- κ B or AP-1 (23). In the present work, we have further defined the mechanism of antagonism between GR and the orphan nuclear receptors related to NGFI-B (Nur 77) by showing that the two other related orphan nuclear receptors Nurr1 and NOR-1 are also targets of GR antagonism (Fig. 2.1, 2.2, 2.3). Further, we have dissected mechanistic requirements for this antagonism by identifying the Nur factor DBD as the target for direct protein:protein interactions between Nur factors and GR (Fig. 2.2, 2.3, 2.4). Direct interaction between these proteins was also supported *in vivo* using a mammalian two-hybrid system (Fig. 2.5A) and most importantly, co-recruitment of GR and Nur77 was shown to occur *in vivo* by co-immunoprecipitation upon hormone treatment of AtT-20 cells (Fig. 2.5B). Taken together, these data present a reciprocal picture for GR and Nur factors in the sense that antagonism between these proteins appears to be dependent on their DNA binding domains. Such model is consistent with prior work on the antagonistic activity of GR with AP-1 (5-7), NF- κ B (8-10) or Nur factors (23).

We also show that GR mutant K461A is capable of repressing NGFI-B-dependent transcription as well as wild type GR whereas this mutant has lost the capacity to repress AP-1 or NF- κ B-dependent transcription (Fig. 2.7). Since these three targets of GR antagonism depend on protein:protein interactions rather than direct GR DNA binding, the nature of these interactions appear different as they are not dependent on residue K461 for NGFI-B, but they are for AP-1 and NF- κ B. Thus, antagonism between two nuclear receptors (GR and Nur factors) appears to have particular requirements by comparison to antagonism between GR and other structural classes of DNA binding proteins.

In view of the direct interaction between the DBDs of GR and NGFI-B (Fig. 2.4), it was formally possible that GR and Nur77 might antagonize each other's activity by

formation of heterodimers such as those that form between many different nuclear receptors like GR and AR (55;56), Nurr1 and RXR (50) or Nur77 and COUP-TF (57). We have shown that specific D-loop residues of GR required its homodimerization (40) are not involved in the interaction with NGFI-B since their mutation did not impair GR antagonism of NGFI-B activity (Fig. 2.6B) ruling out the involvement of this well documented dimerization interface. This observation is consistent with prior demonstration that *in vitro* interaction between these two proteins impairs their respective DNA binding activities (23). Although the Nur factor DBD appears to be the primary determinant for antagonism of GR activity, other Nur factor domains may also contribute to antagonism. Indeed, we showed in cotransfection assays that Nurr1 and NGFI-B DBD is sufficient to antagonize GR dependent activity, but with less efficiency than full-length Nur factors (Fig. 2.2C, Fig. 2.3C). The N-terminal domain of NGFI-B may have an auxiliary role in interaction and transcriptional antagonism as revealed with N-terminal deletion mutants (Fig. 2.2C). Consistent with this model, the N-terminal truncated receptors did not interact as efficiently with GR DBD as full-length NGFI-B (Fig. 2.4A). Similar observations were made for Nurr1 (Fig. 2.4B). The C-terminal domain of nuclear receptors such as GR has been implicated in dimerization but, again highlighting the unique features of their antagonistic interactions, the NGFI-B or Nurr1 C-terminal domains are not involved in GR antagonism as revealed with deletion mutants (Fig. 2.2, 2.3). Similarly, the Nur77 C-terminus was not involved in formation of heterodimers with COUP-TF (57). Previous studies have demonstrated that GR DBD is essential for interaction with AP-1 (5) and that this interaction is stabilised by the GR C-terminal domain. In contrast, the GR DBD is sufficient for interaction with Nur factors as shown in pull-down assays (Fig. 2.1B). In summary, the DBDs of GR and Nur factors appear to be the primary determinants for interaction and antagonism of transcription. The mechanism of repression through protein:protein interactions remains poorly understood (2). Originally, it was proposed that antagonistic factors prevented each other's DNA binding ability through complex formation (5). Later, this model was revised to take into account the maintenance of promoter occupancy (i.e. DNA binding) even in presence of the antagonistic factors and the tethering model was proposed (58;59). It is only very recently that further insight into this model was provided through investigation of *in vivo* recruitment of factors and co-factors on the IL-8 and ICAM-1 promoters upon hormone treatment (54). This study revealed a unique pattern of serine-2 phosphorylation of the RNA pol II C-terminal repeat (CTD) on the promoters of genes

subjected to antagonism between NF- κ B and GR. GR trans-repression may also involve recruitment of HDAC2 to the NF- κ B/CBP complex (60).

Antagonism between GR and Nur factors has been implicated in two essential roles of maintenance and homeostasis. First, during maturation of T-cells, Nur factors responsive to the T-cell receptor (TCR) signalling promote apoptosis and this response is antagonized by Gc (44-46). Also, Nur factors mediating the action of hypothalamic CRH, activate transcription of the pituitary POMC gene and this action is antagonized by GR (23). This feedback interaction may be altered in patients with Cushing disease, or in patients and animals under chronic stress.

2.6.ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to V. Giguère (NGFI-B), O.Conneely (Nurr1), N. Ohkura (NOR-1), T. Perlmann (Gal4-Nurr1, Gal4-NGFI-B), K. Yamamoto (6RGR, rBal117, GR K461A), M. Michalak (GST-GR(DBD)) and G. Schütz (GRD4X, GRA458T) for generously providing plasmids. The excellent secretarial assistance of L. Laroche was very appreciated. This work was supported by the Medical Research Council of Canada (MRC). M.M. is recipient of a MRC studentship, S.B. is recipient of FCAR-FRSQ health studentship.

2.7.REFERENCES

1. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, et al 1995 The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83:835-839
2. Beato M, Herrlich P, Schutz G 1995 Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell* 83:851-857
3. Saatcioglu F, Claret FX, Karin M 1994 Negative transcriptional regulation by nuclear receptors. *Semin Cancer Biol* 5:347-359
4. McKay LI, Cidlowski JA 1998 Cross-talk between nuclear factor-kappa B and the steroid hormone receptors: mechanisms of mutual antagonism. *Mol Endocrinol* 12:45-56
5. Yang-Yen HF, Chambard JC, Sun YL, Smeal T, Schmidt TJ, Drouin J, Karin M 1990 Transcriptional interference between c-jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell* 62:1205-1215
6. Jonat C, Rahmsdorf HJ, Park K-K, Cato ACB, Gebel S, Ponta H, Herrlich P 1990 Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (fos/jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* 62:1189-1204
7. Schule R, Rangarajan P, Kliewer S, Ransone LJ, Bolado J, Yang N, Verma IM, Evans RM 1990 Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor. *Cell* 62:1217-1226
8. Ray A, Prefontaine KE 1994 Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:752-756
9. Caldenhoven E, Liden J, Wissink S, Van de Stolpe A, Raaijmakers J, Koenderman L, Okret S, Gustafsson JA, van der Saag PT 1995 Negative cross-talk between RelA and the glucocorticoid receptor: a possible mechanism for the antiinflammatory action of glucocorticoids. *Mol Endocrinol* 9:401-412
10. Scheinman RI, Gualberto A, Jewell CM, Cidlowski JA, Baldwin AS, Jr. 1995 Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF-kappa B by activated glucocorticoid receptors. *Mol Cell Biol* 15:943-953
11. Wissink S, van Heerde EC, van der BB, van der Saag PT 1998 A dual mechanism mediates repression of NF-kappaB activity by glucocorticoids. *Mol Endocrinol* 12:355-363

12. Kamei Y, Xu L, Heinzl T, Torchia J, Kurokawa R, Gloss B, Lin SC, Heyman RA, Rose DW, Glass CK, Rosenfeld MG 1996 A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* 85:403-414
13. De Bosscher K, Vanden Berghe W, Haegeman G 2001 Glucocorticoid repression of AP-1 is not mediated by competition for nuclear coactivators. *Mol Endocrinol* 15:219-227
14. Malkoski SP, Dorin RI 1999 Composite glucocorticoid regulation at a functionally defined negative glucocorticoid response element of the human corticotropin-releasing hormone gene. *Mol Endocrinol* 13:1629-1644
15. Cole TJ, Blendy JA, Monaghan AP, Kriegstein K, Schmid W, Aguzzi A, Fantuzzi G, Hummler E, Unsicker K, Schutz G 1995 Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation. *Genes Dev* 9:1608-1621
16. Raber J 1998 Detrimental effects of chronic hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation. From obesity to memory deficits. *Mol Neurobiol* 18:1-22
17. Gagner J-P, Drouin J 1985 Opposite regulation of pro-opiomelanocortin gene transcription by glucocorticoids and CRH. *Mol Cell Endocrinol* 40:25-32
18. Gagner J-P, Drouin J 1987 Tissue-specific regulation of pituitary proopiomelanocortin gene transcription by corticotropin-releasing hormone, 3', 5'-cyclic adenosine monophosphate, and glucocorticoids. *Mol Endocrinol* 1:677-682
19. Drouin J, Trifiro MA, Plante RK, Nemer M, Eriksson P, Wrangé Ö 1989 Glucocorticoid receptor binding to a specific DNA sequence is required for hormone-dependent repression of pro-opiomelanocortin gene transcription. *Mol Cell Biol* 9:5305-5314
20. Drouin J, Sun YL, Chamberland M, Gauthier Y, De Léan A, Nemer M, Schmidt TJ 1993 Novel glucocorticoid receptor complex with DNA element of the hormone-repressed POMC gene. *EMBO J* 12:145-156
21. Reichardt HM, Kaestner KH, Tuckermann J, Kretz O, Wessely O, Bock R, Gass P, Schmid W, Herrlich P, Angel P, Schutz G 1998 DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell* 93:531-541
22. Riegel AT, Lu Y, Remenick J, Wolford RG, Berard DS, Hager GL 1991 Proopiomelanocortin gene promoter elements required for constitutive and glucocorticoid-repressed transcription. *Mol Endocrinol* 5:1973-1982

23. Philips A, Maira MH, Mullick A, Chamberland M, Lesage S, Hugo P, Drouin J 1997 Antagonism between Nur77 and glucocorticoid receptor for control of transcription. *Mol Cell Biol* 17:5952-5959
24. Philips A, Lesage S, Gingras R, Maira MH, Gauthier Y, Hugo P, Drouin J 1997 Novel dimeric Nur77 signaling mechanisms in endocrine and lymphoid cells. *Mol Cell Biol* 17:5946-5951
25. Hazel TG, Nathans D, Lau LF 1988 A gene inducible by serum growth factors encodes a member of the steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:8444-8448
26. Milbrandt J 1988 Nerve growth factor induces a gene homologous to the glucocorticoid receptor gene. *Neuron* 1:183-188
27. Wilson TE, Fahrner TJ, Johnston M, Milbrandt J 1991 Identification of the DNA binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast. *Science* 252:1296-1300
28. Wilson TE, Mouw AR, Weaver CA, Milbrandt J, Parker KL 1993 The orphan nuclear receptor NGFI-B regulates expression of the gene encoding steroid 21-hydroxylase. *Mol Cell Biol* 13:861-868
29. Maira MH, Martens C, Philips A, Drouin J 1999 Heterodimerization between members of the Nur subfamily of orphan nuclear receptors as a novel mechanism for gene activation. *Mol Cell Biol* 19:7549-7557
30. Law SW, Conneely OM, DeMayo FJ, O'Malley BW 1992 Identification of a new brain-specific transcription factor, NURR1. *Mol Endocrinol* 6:2129-2135
31. Ohkura N, Hijikuro M, Yamamoto A, Miki K 1994 Molecular cloning of a novel thyroid/steroid receptor superfamily gene from cultured rat neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 205:1959-1965
32. Drouin J, Maira MH, Philips A 1998 Novel mechanism of action for Nur77 and antagonism by glucocorticoids: a convergent mechanism for CRH activation and glucocorticoid repression of POMC gene transcription. *J Steroid Biochem Mol Biol* 65:59-63
33. Honkaniemi J, Kononen J, Kainu T, Pyykonen I, Pelto-Huikko M 1994 Induction of multiple immediate early genes in rat hypothalamic paraventricular nucleus after stress. *Brain Res* 25:234-241
34. Saucedo-Cardenas O, Conneely OM 1996 Comparative distribution of NURR1 and NUR77 nuclear receptors in the mouse central nervous system. *J Mol Neurosci* 7:51-63

35. Murphy EP, Conneely OM 1997 Neuroendocrine regulation of the hypothalamic pituitary adrenal axis by the nurr1/nur77 subfamily of nuclear receptors. *Mol Endocrinol* 11:39-47
36. Davis IJ, Lau LF 1994 Endocrine and neurogenic regulation of the orphan nuclear receptors Nur77 and Nurr-1 in the adrenal glands. *Mol Cell Biol* 14:3469-3483
37. Nordeen SK 1988 Luciferase reporter gene vectors for analysis of promoters and enhancers. *BioTechniques* 6:454-456
38. Miesfeld R, Rusconi S, Godowski PJ, Maler BA, Okret S, Wikstrom AC, Gustafsson JA, Yamamoto KR 1986 Genetic complementation of a glucocorticoid receptor deficiency by expression of cloned receptor cDNA. *Cell* 46:389-399
39. Burns K, Duggan B, Atkinson EA, Famulski KS, Nemer M, Bleackley RC, Michalak M 1994 Modulation of gene expression by calreticulin binding to glucocorticoid receptor. *Nature* 367:476-480
40. Heck S, Kullmann M, Gast A, Ponta H, Rahmsdorf HJ, Herrlich P, Cato AC 1994 A distinct modulating domain in glucocorticoid receptor monomers in the repression of activity of the transcription factor AP-1. *EMBO J* 13:4087-4095
41. Starr DB, Matsui W, Thomas JR, Yamamoto KR 1996 Intracellular receptors use a common mechanism to interpret signaling information at response elements. *Genes Dev* 10:1271-1283
42. Perlmann T, Jansson L 1995 A novel pathway for vitamin A signaling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and NURR1. *Genes Dev* 9:769-782
43. Tremblay JJ, Marcil A, Gauthier Y, Drouin J 1999 Ptx1 regulates SF-1 activity by an interaction that mimics the role of the ligand-binding domain. *EMBO J* 18:3431-3441
44. Woronicz JD, Calnan B, Ngo V, Winoto A 1994 Requirement for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis of T-cell hybridomas. *Nature* 367:277-281
45. Liu ZG, Smith SW, McLaughlin KA, Schwartz LM, Osborne BA 1994 Apoptotic signals delivered through the T-cell receptor of a T- cell hybrid require the immediate-early gene nur77. *Nature* 367:281-284
46. Calnan BJ, Szychowski S, Chan FK, Cado D, Winoto A 1995 A role for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis accompanying antigen-induced negative selection. *Immunity* 3:273-282
47. Cheng LEC, Chan FKM, Cado D, Winoto A 1997 Functional redundancy of the Nur77 and Nur-1 orphan steroid receptors in T-cell apoptosis. *EMBO J* 16:1865-1875

48. Paulsen RE, Weaver CA, Fahrner TJ, Milbrandt J 1992 Domains regulating transcriptional activity of the inducible orphan receptor NGFI-B. *J Biol Chem* 267:16491-16496
49. Davis IJ, Hazel TG, Chen RH, Blenis J, Lau LF 1993 Functional domains and phosphorylation of the orphan receptor Nur77. *Mol Endocrinol* 7:953-964
50. Castro DS, Arvidsson M, Bondesson Bolin M, Perlmann T 1999 Activity of Nur1 carboxyl-terminal domain depends on cell type and integrity of the activation function 2. *J Biol Chem* 274:37483-37490
51. Hard T, Kellenbach E, Boelens R, Maler BA, Dahlman K, Freedman LP, Carlstedt-Duke J, Yamamoto KR, Gustafsson JA, Kaptein R 1990 Solution structure of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain. *Science* 249:157-160
52. Luisi BF, Xu WX, Otwinowski Z, Freedman LP, Yamamoto KR, Sigler PB 1991 Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature* 352:497-505
53. Meyer T, Starr DB, Carlstedt-Duke J 1997 The rat glucocorticoid receptor mutant K461A differentiates between two different mechanisms of transrepression. *J Biol Chem* 272:21090-21095
54. Nissen RM, Yamamoto KR 2000 The glucocorticoid receptor inhibits NFkappaB by interfering with serine-2 phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev* 14:2314-2329
55. Chen S, Wang J, Yu G, Liu W, Pearce D 1997 Androgen and glucocorticoid receptor heterodimer formation. A possible mechanism for mutual inhibition of transcriptional activity. *J Biol Chem* 272:14087-14092
56. Liu W, Wang J, Sauter NK, Pearce D 1995 Steroid receptor heterodimerization demonstrated in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:12480-12484
57. Wu Q, Li Y, Liu R, Agadir A, Lee MO, Liu Y, Zhang X 1997 Modulation of retinoic acid sensitivity in lung cancer cells through dynamic balance of orphan receptors nur77 and COUP-TF and their heterodimerization. *EMBO J* 16:1656-1669
58. König H, Ponta H, Rahmsdorf HJ, Herrlich P 1992 Interference between pathway-specific transcription factors: glucocorticoids antagonize phorbol ester-induced AP-1 activity without altering AP-1 site occupation in vivo. *EMBO J* 11:2241-2246
59. Reik A, Stewart AF, Schutz G 1994 Cross-talk modulation of signal transduction pathways: two mechanisms are involved in the control of tyrosine aminotransferase gene expression by phorbol esters. *Mol Endocrinol* 8:490-497

60. Ito K, Barnes PJ, Adcock IM 2000 Glucocorticoid receptor recruitment of histone deacetylase 2 inhibits interleukin-1beta-induced histone H4 acetylation on lysines 8 and 12. *Mol Cell Biol* 20:6891-6903

3.ARTICLE 2

COACTIVATOR RECRUITMENT BY THE NGFI-B (Nur77) SUBFAMILY OF ORPHAN NUCLEAR RECEPTOR REQUIRES DIMER BINDING SITE AND N-TERMINAL AF-1 DOMAIN

Christine Martens, Mario Maira, Yves Gauthier, Jacques Drouin*

Laboratoire de génétique moléculaire
Institut de recherches cliniques de Montréal

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

***Corresponding author:** Dr Jacques Drouin
Laboratoire de génétique moléculaire
Institut de recherches cliniques de Montréal

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

3.1.ABSTRACT

Current concepts on the mechanisms of nuclear receptor action involve the recruitment to receptor dimers of coactivators that are responsible for transcription enhancement. Within this general framework, a small subset of nuclear receptors stand out by their ability to activate transcription as monomers rather than dimers. Whereas SF-1 acting as monomer recruits coactivators of the p160 family, nuclear receptors related to NGFI-B (Nur77) activate transcription as monomers but apparently without recruitment of p160 coactivators. We have recently shown that the subfamily of NGFI-B related factors (the Nur factors comprising NGFI-B (Nur77), Nurr1 and NOR1) can form homo- or heterodimers and that these may be more biologically relevant in endocrine and lymphoid cells. We therefore re-assessed the putative involvement of coactivators in the mechanisms of transcriptional activation by Nur factor dimers. We show that dimer formation of Nur factors on the NurRE site favors the recruitment of the p160 coactivators, while monomeric binding of Nur factors on the NBRE site does'nt. All three p160 coactivators tested (SRC-1, SRC-2, and SRC-3) enhance NurRE-dependent activity of Nur factors. The activity of SRC-1 is further enhanced by the integrator co-factor CBP and coactivator action appears to be primarily mediated through the N-terminus of NGFI-B and Nurr1. Taken together, these data reinforce the notion that dimers of Nur factors may be more biologically relevant than monomers. By comparison to other nuclear receptors, their transcriptionally active domain appears to be the AF-1 rather than AF-2 domain.

3.2.INTRODUCTION

The nuclear receptor (NR) superfamily includes receptors for steroids, thyroid hormone, vitamin D, retinoids and finally, the orphan nuclear receptors for which no ligand has been identified. They all have a common structure that includes a N-terminal domain with an autonomous activation function (AF-1), a DNA binding domain (DBD) composed of two zinc finger motifs, and a C-terminal domain that contains the ligand binding domain (LBD), a ligand-dependent activation function (AF-2), a dimerization interface and a nuclear localization signal (1). Almost all NRs bind DNA and activate transcription as dimers, either homodimers or heterodimers involving the general dimerization partner RXR (2;3). Most of the NR homodimers bind DNA response elements that have a palindromic organization whereas the RXR containing heterodimers most often act on response elements that are constituted of direct repeats of a basic motif (2;4). The transcriptional activity of many NR dimers is dependent on

binding of a ligand to the C-terminal LBD and the molecular mechanism of ligand-induced transcriptional activity requires recruitment of a coactivator protein to the AF2 domain. A large group of NR coactivators have been identified [reviewed in (5-10)]. One of the best-studied classes of coactivators is the p160 family of coactivators that includes SRC-1/NCoA-1, SRC-2/Tif-2/GRIP1/NCoA-2 and SRC-3/pCIP/ACTR/AIB-1. The p160 coactivators mediate ligand-dependent transactivation through recruitment at the AF-2 domain. In addition these coactivators interact with the carboxy terminal region of CBP/p300 (11;12), another transcriptional cofactor which itself interacts with NRs and which appears to play the role of a transcriptional integrator (13;14). Until recently, it was thought that the AF-2 dependent recruitment of coactivators was sufficient to account for ligand-dependent activity; however, recent results have also implicated the N-terminal AF-1 domain in the process (15-19). Although most NRs studied for co-activation dependence activate transcription on dimers, a similar paradigm was proposed for SF-1 acting as a monomeric activator of transcription (20). However, the p160 coactivators do not appear to be involved in transcription activation by NGFI-B monomer (21).

NGFI-B (22;23) also called Nur77 (24) has high homology with two other NRs, Nurr1 (Nur-related factor-1) (25) and NOR-1 (Neuron-derived orphan receptor) (26). NGFI-B is an immediate early gene that is rapidly activated in response to a variety of cellular signals such as membrane depolarization (27) or growth factors like nerve growth factor (22). Although these orphan NRs do not have any known ligand for their LBD, it was shown in many systems that their transcriptional activity is tightly regulated by signals elicited at the cellular membrane such as those triggered by growth factors. Thus, the NGFI-B related NRs (Nur factors) have been implicated as important signaling intermediates for the control of T-cell apoptosis (28-32), neuronal differentiation (33;34) and in regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis (31;34-40). The *in vivo* analysis of the role of the Nur factors has supported the idea that their activity is to some extent redundant in many systems (29).

The Nur factors bind the NBRE target sequence as monomers (35;41) and, as indicated above, their transcriptional activity does not appear to require p160 coactivators in this context (21). We have recently identified the NurRE (Nur Response Element) target sequence as a binding site for homo-or heterodimers of the same NRs (31). The dimer target sequence is far more responsive to Nur factors than the NBRE and it is responsive to physiological stimuli under conditions where the NBRE is not (42).

Previous studies demonstrated that activation by NGFI-B monomers depends essentially on the AF-1 domain, while the C-terminal domain is dispensable for transcriptional activation (43;44). For Nurr1, the C-terminal AF-2 appeared to mediate transcriptional activity although this may be dependent on cell-type (21;45). The implication of the Nurr1 AF-2 in its activity was however unusual in that this activity appeared independent of coactivators like SRC-1, in stark contrast to other NRs (21).

In the present work, we show that the action of NGFI-B, Nurr1 and NOR-1 dimers on NurRE-dependent transcription is greatly enhanced by SRC-1, SRC-2 and SRC-3, in contrast to NBRE-dependent transcription. Moreover, SRC-1 and CBP synergize together to enhance transcriptional activity of Nur factors, also in a dimer-dependent fashion. Further, we demonstrate that the N-terminal domains of Nurr1 and NGFI-B are targeted by p160 coactivators. By showing the exquisite dependence on dimer formation for coactivator recruitment, these data reinforce the model that the Nur factors exert their physiologically relevant action through the formation of dimers.

3.3.MATERIAL AND METHODS

3.3.1.PLASMIDS.

The NurRE and NBRE reporters, as well as NGFI-B, Nurr1 and NOR-1 expression plasmids were previously described (31;42). NGFI-B N-terminal mutants are deleted between amino acids 3 to 36, 3 to 74, 3 to 174 or 3 to 214 and the Δ C mutant is a deletion that ends at aa 380. Δ C Nurr1 mutant is a C-terminal deletion that ends at aa 352 and Nurr1 N-terminal mutants are internal deletion between aa 72 and aa 162, and between aa 160 and aa 236. An oligonucleotide flag (5'-gactacaaggacgacgatgacaag-3') was synthesized for insertion at the N-terminus of Nurr1 DBD. The flag/Nurr1 DBD construct contains Nurr1 sequences from Q₂₄₇ to G₃₉₇. Full-length SRC-1 expression vector was described previously (46). Full-length SRC-2 was provided by P. Chambon and described in (47) and was subcloned in the pCMX vector within the Kpn1 and BamH1 sites. Full-length CBP expression vector was previously described (48).

3.3.2.CELL CULTURE AND TRANSFECTION.

CV-1 and AtT-20 D16v cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% of bovine fetal serum and maintained at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂. CV-1 cells were plated at a density of 50 000 cells per well in 12-well plates the evening prior to transfection and then transfected the next day by the calcium

phosphate coprecipitation method as in (31). The next day cells were rinsed with PBS and fresh DMEM-FBS 10% was added for 24 hours. AtT-20 cells were plated at a density of 250 000 cells per well in 12-well plates the evening prior to transfection. They were transfected using LipofectAMINE (Gibco BRL) as previously described (30). Total amount of transfected DNA was kept constant. Results show a representative experiment which was repeated 3 to 5 times.

3.3.3. PROTEIN OVEREXPRESSION AND ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAYS.

Cos-1 cells were grown under the same conditions as CV-1 and AtT-20 cells. Cells were plated at a density of 1 000 000 cells per 100 mm dish 16 h prior transfection by the calcium phosphate coprecipitation method using 10 μ g expression vector; total amount of DNA was completed to 20 μ g with pSP64. Cells were washed twice with cold PBS and harvested in PBS containing 1mM EDTA. The cells were then centrifuged and resuspended in 400 μ l of buffer A (Tris pH7.9 10mM, KCl 10mM, EDTA 0.1mM, EGTA 0.1 mM, PMSF 0.1mM, aprotinin 1 μ g/ml, leupeptin 1 μ g/ml and pepstatin 1 μ g/ml). Cells were allowed to swell on ice for 15 min before addition of 50 μ l of NP-40 10% followed by vigorous vortexing. After centrifugation, the nuclear pellet was resuspended in 50 μ l of buffer C (20mM Tris pH 7.9, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA and the same protease inhibitor cocktail that was in buffer A) and shaken vigorously at 4°C for 1 hour. The protein concentration of nuclear extracts was estimated by the Bradford assay. 5 μ g nuclear extracts were used for gel shift experiments as previously described (31). *In vitro* translated Flag Nurr1 and flag Nurr1 DBD were obtained by using the TNT coupled reticulocyte lysate system (Promega).

3.4. RESULTS

3.4.1. NURRE- (BUT NOT NBRE-) DEPENDENT TRANSCRIPTION IS ENHANCED BY SRC-1.

A previous report concluded that Nurr1 did not appear to interact with SRC-1 and that its activity was not stimulated by this coactivator (21). We assessed whether activity dependent on NurRE and Nurr1 (or NGFI-B or NOR-1) dimers would also be independent of coactivators. Expression vectors for Nur factors were cotransfected in AtT-20 cells with/without SRC-1 expression plasmid using the NBRE-Luc or NurRE-Luc reporters (Fig. 3.1). SRC-1 did not enhance Nur factors-dependent activity on the NBRE-Luc reporter, as previously reported (21). In striking contrast, SRC-1 enhanced up to 10 times the transcriptional activity of all three Nur factors using the NurRE reporter. Thus, the ability of SRC-1 to enhance Nur-dependent transcription appears to be restricted to

dimers of these factors. We then tested the ability of other p160 coactivators to enhance NGFI-B-dependent transcription (Fig. 3.2). Cotransfection experiments conducted in CV-1 cells using either SRC-1, SRC-2 or SRC-3 indicated that all three p160 coactivators enhance NGFI-B-dependent transcription in a dose-dependent manner.

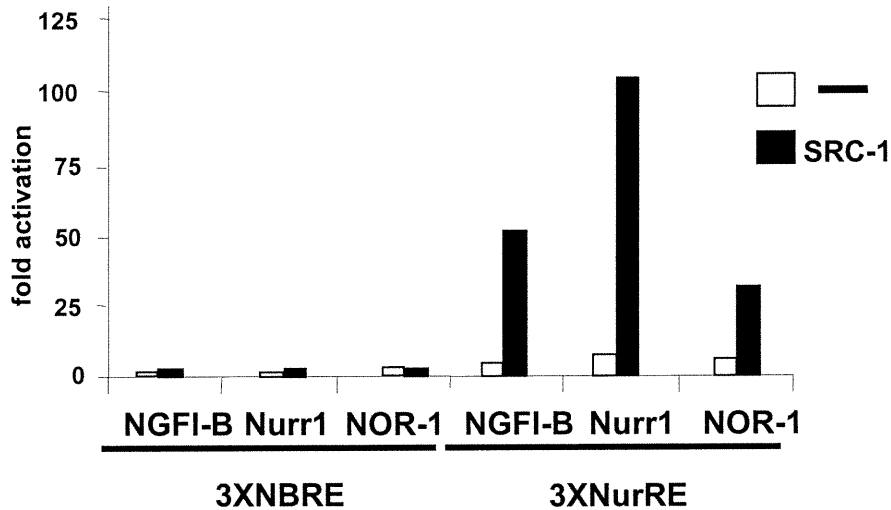


Figure 3.1. SRC-1 enhances NurRE(dimer)-dependent transcription more efficiently than the NBRE(monomer)-dependent transcription. A) Activity of NGFI-B, Nurr1 or NOR-1 expression vector (25 ng) was assessed in AtT-20 cells using 200 ng of NBRE-reporter or NurRE-reporter in presence or absence of SRC-1 expression vector (1 μ g). Data are expressed as ratios of luciferase activity in presence over absence of indicated Nur factor.

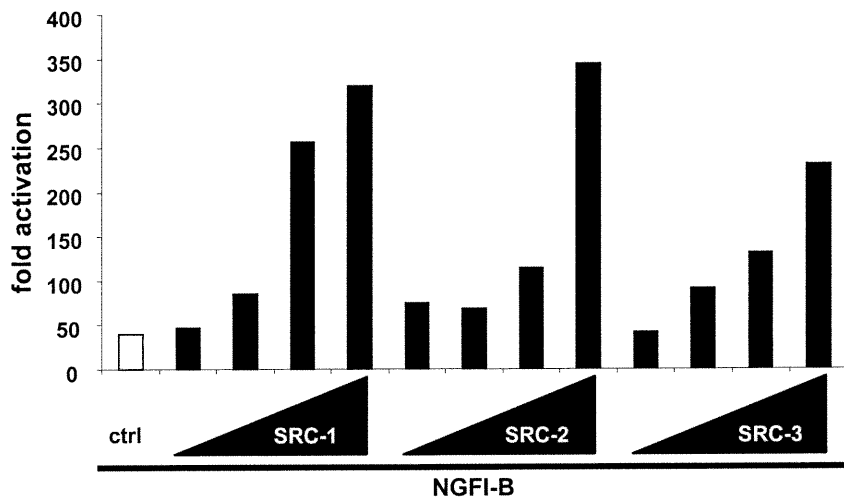


Figure 3.2. Dose-response curves for enhancement of NGFI-B activity by three p160/SRC coactivators. Activity of NGFI-B (open bar, 100 ng) is enhanced by increasing amounts (100-1000 ng) of SRC-1, SRC-2 and SRC-3 expression vector cotransfected with NurRE-reporter (1 μ g) in CV-1 cells. Data are expressed as fold activation compared to activity of reporter in absence of NGFI-B or SRCs.

3.4.2. SYNERGISM BETWEEN NUR FACTORS, SRC-1 AND CBP.

Since SRC-1 is able to interact with the C-terminus of CBP/p300 (12), we tested whether CBP and SRC-1 can act together to enhance Nur factor-dependent transcription. Expression vectors for CBP, SRC-1 or both were cotransfected with vectors for Nur factors in AtT-20 cells. On its own, CBP only slightly enhanced Nur factor-dependent activity by comparison to SRC-1, but together, they synergized to enhance the activity of all three Nur factors (Fig 3.3). Dimerization of the Nur factors also appeared to be important for CBP action since no CBP-dependent enhancement was observed with the NBRE reporter (data not shown). These data are consistent with the current model of co-recruitment of SRC and CBP coactivators by transcriptionally active NRs (9).

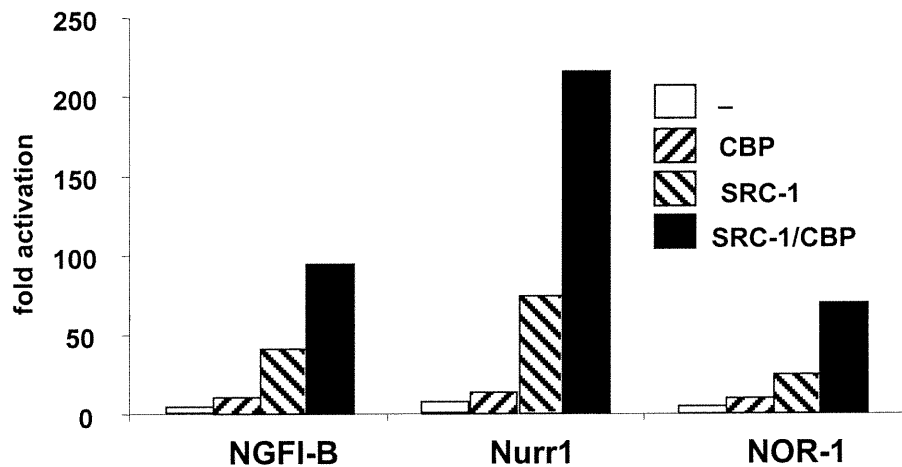


Figure 3.3 Cooperation between SRC-1 and CBP for enhancement of Nur factor activity. Nur factor expression vectors (25 ng) were cotransfected in AtT-20 cells with vectors (1 μ g) for SRC-1, CBP or both, together with the NurRE reporter (300 ng).

3.4.3. NGFI-B AND NURR1 N-TERMINAL DOMAIN IS A TARGET FOR P160 COACTIVATORS.

Prior studies using the NBRE reporter plasmid demonstrated that complete truncation of the NGFI-B C-terminal domain has no effect on activation level compared to the full-length NGFI-B, whereas progressive deletion of NGFI-B N-terminus resulted in a complete loss of transcriptional activity (43;44). We obtained similar results with NGFI-B and Nurr1 using a NurRE reporter (49). For both factors, the major activation function appeared to be the AF-1, although the activity of the Nurr1 C-terminal domain may be cell type-dependent (21). In order to determine whether SRC recruitment by Nur factors co-localized with its activation domains, we used series of truncation mutants of NGFI-B and Nurr1 (Fig.3.4 A) in cotransfection experiments with SRC-1 (Fig. 3.4 B), SRC-2 (Fig.

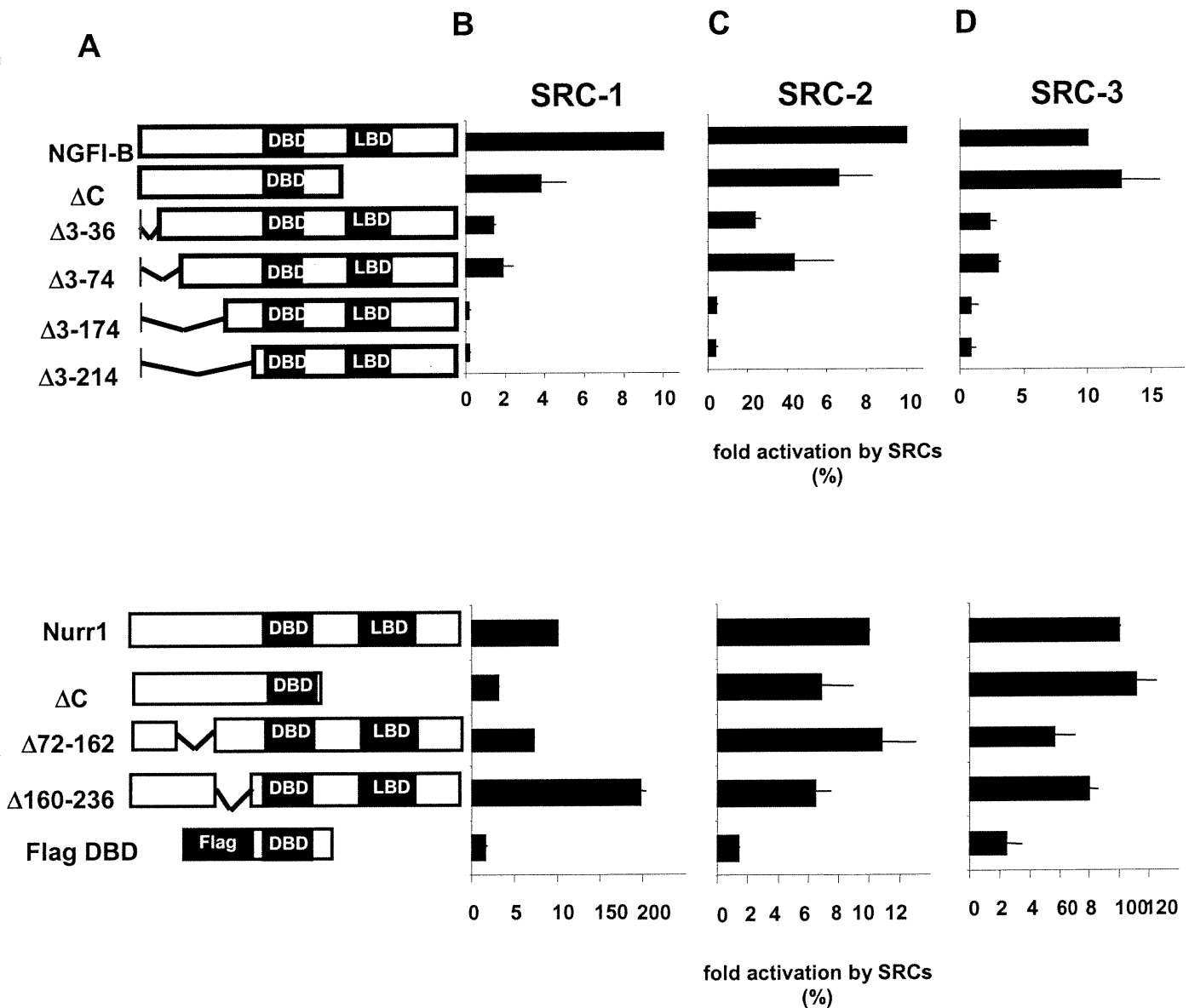


Figure 3.4. Nur factor N-terminus is primary target for SRC enhancement of transcription. A) Schematic representation of NGFI-B and Nurr1 constructs. Enhancement of NGFI-B or Nurr1-dependent transcription assessed with NurRE reporter is shown for SRC-1 (B), SRC-2 (C) and SRC-3 (D). Cotransfection experiments were performed in CV-1 cells using 750 ng of NurRE-reporter, 10 ng of NGFI-B constructs or 20 ng of Nurr1 constructs and SRC-1, SRC-2 or SRC-3 expression plasmids (500 ng for NGFI-B series and 1 mg for Nurr1 series). Data (means \pm s.e.m., n=6) are expressed as percentage SRC-dependent fold activation of wild-type NGFI-B or Nurr1.

3.4 C) and SRC-3 (Fig. 3.4 D). Only SRC-1, but not SRC-2 or SRC-3, recruitment/enhancement was affected by deletion of NGFI-B or Nurr1 C-terminus; this reduction was about 50-70% (Fig. 3.4B). Progressive deletion of the N-terminal domain of NGFI-B resulted in a complete loss of SRC-dependent enhancement. Deletion of NGFI-B amino acids (aa) 3 to 36 resulted in a first decrease of SRC-dependent activity for all three SRCs and further deletion to position 74 did not further affect activity (Fig. 3.4 B, C, D). This localization correlates well with the identification of NBRE- (43;44) and NurRE-(49) dependent AF-1 activity within the aa 20 to 36 interval. The remaining SRC-dependent activity was completely lost upon deletion of sequences between aa 74 and 174. Again, this region was also involved in NBRE- and NurRE-dependent NGFI-B activity (49). The differences in SRC-enhancement of NGFI-B mutants cannot be ascribed to differences in expression levels since all deletion mutants were, at least, as efficiently expressed as NGFI-B (Fig. 3.5 A).

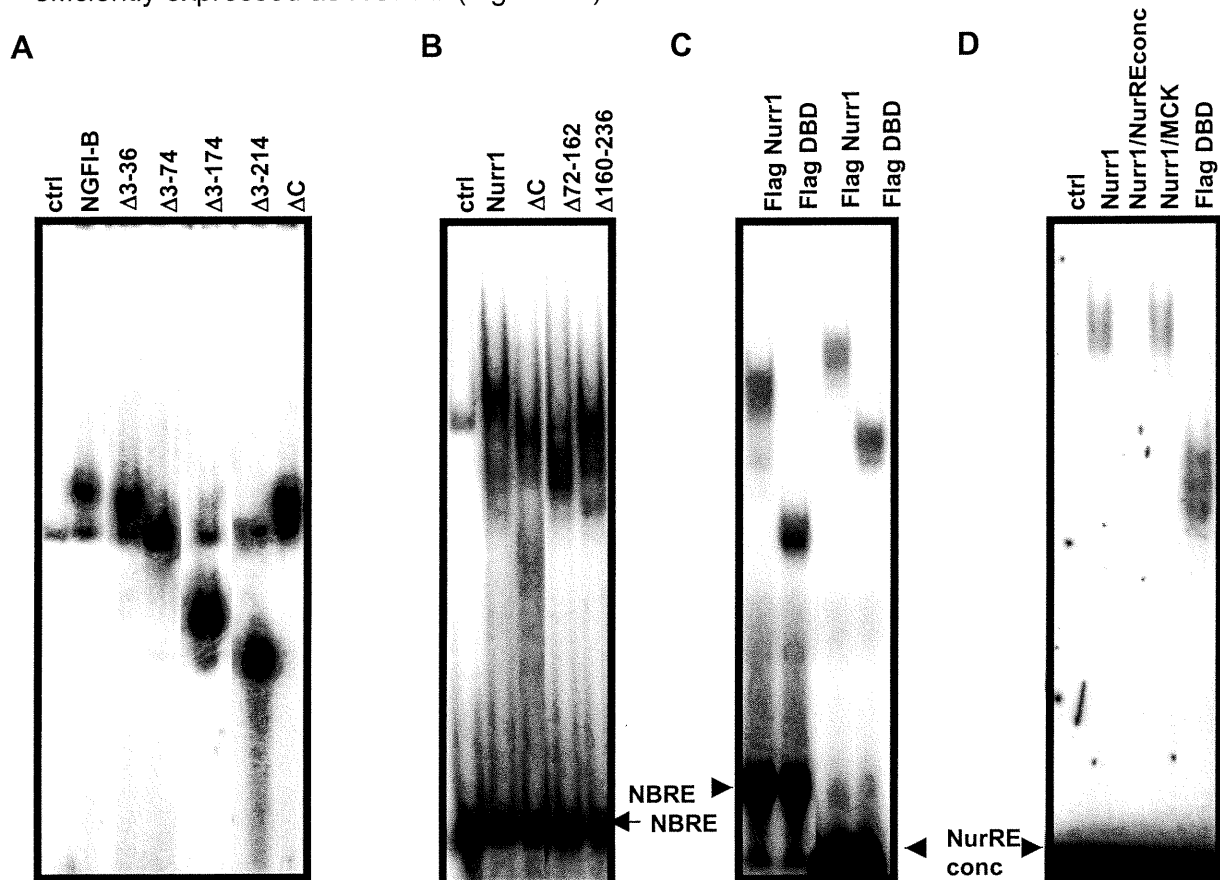


Figure 3.5. Nur factors DNA binding activity in nuclear extracts of transfected cells. NGFI-B (A) and Nurr1 (B) constructs are expressed at similar levels in nucleus of transfected cells. Levels of wild-type and mutant Nur factors were assessed by gel retardation using NBRE probe and nuclear extracts of transfected Cos1 cells. C) Nurr1 DBD is sufficient to form dimers. *In vitro* translated flag Nurr1 DBD was used in gel retardation experiments with NBRE or consensus NurRE probes as indicated. D) The flagNurr1 DBD construct is expressed at high level compared to Nurr1 in nucleus of transfected cells. Nurr1 binding activity is competed by homologous probe oligonucleotide (NurREconc) but not by an unrelated oligonucleotide (MCK).

Although less conclusive, the Nurr1 deletion analysis suggested a similar organization for this factor. The Nurr1 C-terminus appeared to play a more important role than NGFI-B C-terminus; however, the Nurr1 C-terminal deletion contains a more severe deletion that may impair localization or DNA binding activity (Fig. 3.5B). Similarly, the Nurr1 N-terminal deletions each delete only part of sequences homologous to NGFI-B aa 74-174, such that the weaker effect of these deletions could be ascribed to the presence of important sequences within the first 74 aa or to a composite SRC target domain. For SRC-1 and Nurr1, most activity may be due to the AF-2 domain (Fig 3.4 B), but this does not appear to be the case for SRC-2 and SRC-3 (Fig. 3.4 C,D). Clearly, the DBD is not sufficient for SRC enhancement despite the fact that it appeared sufficient for NurRE binding as dimer (Fig. 3.5 C,D). All together, these data highlight the importance of the N-terminal AF-1 domain for SRC enhancement of Nur dimer activity. Of the three p160 coactivators tested, SRC-1 appeared to have greater AF-2 dependent activity than SRC-2 or -3.

3.5.DISCUSSION

Considerable insight was gained on the mechanisms for TA by NRs, particularly after the identification of transactivation domains and of the coactivators that interact with them. Thus, ligand binding is thought to induce conformational changes in the LBD that result in association between the NR AF-2 domain and coactivators, which in turn, contact the basal transcriptional machinery to increase transcription. Recent evidence has also supported the involvement of the AF-1 domain for coactivator recruitment (21-25). The Nur factors are atypical, but not unique, in the NR superfamily because of their DNA binding and activity as monomers; however, it does not seem that monomer activity *per se* accounts for Nur factor's inability to recruit p160 coactivators [(21) and Fig. 3.1] since another monomer acting NR, SF-1, does recruit these coactivators (50-52). Thus, Nur factors only appear competent to recruit p160 coactivators and CBP when they interact with NurRE as dimers (Fig. 3.1 and 3.3). In a sense then, Nur factors behave like other NRs when they interact with NurRE, but not with NBRE: the challenge is now to verify the *in vivo* relevance of the model of NBRE-bound Nur factor monomers because it isn't supported by well-documented target genes/sites nor by a cogent mechanisms of TA.

Why are Nur factor monomers so inefficient at coactivator recruitment? Although it is difficult to completely rule out the possibility that permissive experimental conditions have not yet been identified, it is also possible that signals resulting in specific Nur factor

modification such as phosphorylation might be required for monomer recruitment of SRCs. For SF-1, phosphorylation was shown to modulate cofactor recruitment (52). However, we have shown that PKA-induced modification(s) is (are) not sufficient for this because we have shown that this signaling also operates only on Nur factor dimers (49). The AF-1 domain of NGFI-B is most important for transcriptional enhancement by all three SRCs, but its AF-2 domain only appeared relevant for SRC-1 but not SRC-2 or SRC-3 activity (Fig. 3.4). Since it is not known whether NGFI-B has a ligand, we cannot exclude the possibility that the AF-2 domain could be more important for transcription and for SRC interaction. It is conceivable that under our assay conditions, we failed to detect ligand-dependent transactivation function. Similarly for Nurr1, it is SRC-1 activity that appeared to require the AF-2 domain, but not SRC-2 and SRC-3. Be that as it may, it is clear that the NGFI-B AF-1 domain is essential for its activity. In fact the Δ 3-214 mutant of NGFI-B is not only inert (Fig. 3.4) but it has potent dominant negative activity against all three Nur factors both in cell transfection and *in vivo* (29). It is possible that this orphan NR evolved toward a greater dependence on its N-terminal AF-1 domain in parallel with the targeting of cytoplasmic signals to this domain. Indeed, it was suggested that cyclosporin A-sensitive signals require the Nur77 N-terminus for their effect in T cells (53) and we have shown a very large PKA enhancement of NGFI-B activity that is entirely dependent on its AF-1 domain (49).

The three SRCs tested in this series of experiments have very different abilities to enhance the NGFI-B and Nurr1 AF-1 or AF-2 activities (Fig. 3.4). As mentioned above, only SRC-1 appeared dependent on NGFI-B and Nurr1 AF-2. Also, only SRC-1-dependent activity was enhanced by the Δ 160-236 deletion of Nurr1. These differences are very suggestive of specificity in the ability of each SRC to interact with one or the other AF domain. This specificity could be intrinsic (i.e. depend on the specific aa sequence of comparable domains) or it could also be due to p160 coactivator modification. Indeed, p160 coactivators can themselves be phosphorylated by different signaling pathways. SRC-1 was recently shown to be phosphorylated by Erk-2 (54) and SRC-3 by mitogen-activated protein kinase (MAPK) (55): these phosphorylations enhance the transactivation potency of the coactivator. It is therefore possible that depending on the cell-type, some coactivators will be more potent than others because of signal-dependent phosphorylation. Similarly, this might explain why we only observed the effect of CBP on Nur factors transcriptional activity in AtT-20 but not CV-1 cells (data not shown). Although CBP was shown to be a phosphorylation target for many kinases,

it appears that impact of these phosphorylations is still poorly understood (56). It is thus reasonable to expect that the action of coactivators on Nur dimers might be cell-dependent as it was shown for other NRs or other transcription factors.

In summary, by showing that Nur factor dimers recruit p160/SRC coactivators for their transcriptional activity, we provide further evidence that these orphans regulate transcription by similar mechanisms as other NRs and that their action as dimers might be more relevant than as monomers. It is by their greater dependence on AF-1, rather than AF-2, domains for transcription activation and for receiving signals that the Nur factors differ from other NRs.

3.6.ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to V. Giguère (NGFI-B, SRC-1, SRC-3), P. Chambon (Tif-2/SRC-2), O.Conneeley (Nurr1), N. Ohkura (NOR-1) and R. Goodman (CBP) for generously providing cDNA plasmids. The help provided by V. Montplaisir for gel shift experiments was useful. The excellent secretarial assistance of L. Laroche was very appreciated. This work was supported by the Medical Research Council of Canada (MRC). M.M. is recipient of a MRC studentship.

3.7. REFERENCE

1. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, et al 1995 The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83:835-839
2. Mangelsdorf DJ, Evans RM 1995 The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83:841-850
3. Keller H, Givel F, Perroud M, Wahli W 1995 Signaling cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor/retinoid X receptor and estrogen receptor through estrogen response elements. *Mol Endocrinol* 9:794-804
4. Glass CK 1994 Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocr Rev* 15:391-407
5. Egea PF, Klaholz BP, Moras D 2000 Ligand-protein interactions in nuclear receptors of hormones. *FEBS Lett* 476:62-67
6. Glass CK, Rose DW, Rosenfeld MG 1997 Nuclear receptor coactivators. *Curr Opin Cell Biol* 9:222-232
7. Freedman LP 1999 Increasing the complexity of coactivation in nuclear receptor signaling. *Cell* 97:5-8
8. McKenna NJ, Xu J, Nawaz SY, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW 1999 Nuclear receptor coactivators: multiple enzymes, multiple complexes, multiple functions. *J Steroid Biochem Mol Biol* 69:3-12
9. McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW 1999 Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev* 20:321-344
10. Robyr D, Wolfe AP, Wahli W 2000 Nuclear hormone receptor coregulators in action: diversity for shared tasks. *Mol Endocrinol* 14:329-347
11. Kamei Y, Xu L, Heinzl T, Torchia J, Kurokawa R, Gloss B, Lin SC, Heyman RA, Rose DW, Glass CK, Rosenfeld MG 1996 A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* 85:403-414
12. Yao TP, Ku G, Zhou N, Scully R, Livingston DM 1996 The nuclear hormone receptor coactivator SRC-1 is a specific target of p300. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:10626-10631
13. Gelman L, Zhou G, Fajas L, Raspe E, Fruchart JC, Auwerx, J. 1999 p300 interacts with the N- and C-terminal part of PPARgamma2 in a ligand-independent and -dependent manner, respectively. *J Biol Chem* 274:7681-7688

14. Li M, Pascual G, Glass CK 2000 Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent repression of the inducible nitric oxide synthase gene. *Mol Cell Biol* 20:4699-4707
15. Hittelman AB, Burakov D, Iniguez-Lluhi JA, Freedman LP 1999 Differential regulation of glucocorticoid receptor transcriptional activation via AF-1-associated proteins. *EMBO J* 18:5380-5388
16. Webb P, Nguyen P, Shinsako J, Anderson C, Feng W, Nguyen MP, Chen D, Huang SM, Subramanian S, McKinerney E, Katzenellenbogen BS, Stallcup MR, Kushner PJ 1998 Estrogen receptor activation function 1 works by binding p160 coactivator proteins. *Mol Endocrinol* 12:1605-1618
17. Onate SA, Boonyaratanakornkit V, Spencer TE, Tsai SY, Tsai MJ, Edwards DP, O'Malley BW 1998 The steroid receptor coactivator-1 contains multiple receptor interacting and activation domains that cooperatively enhance the activation function 1 (AF1) and AF2 domains of steroid receptors. *J Biol Chem* 273:12101-12108
18. Alen P, Claessens F, Verhoeven G, Rombauts W, Peeters B 1999 The androgen receptor amino-terminal domain plays a key role in p160 coactivator-stimulated gene transcription. *Mol Cell Biol* 19:6085-6097
19. Tremblay A, Tremblay GB, Labrie F, Giguere V 1999 Ligand-independent recruitment of SRC-1 to estrogen receptor beta through phosphorylation of activation function AF-1. *Mol Cell* 3:513-519
20. Yu RN, Ito M, Jameson JL 1998 The murine Dax-1 promoter is stimulated by SF-1 (steroidogenic factor-1) and inhibited by COUP-TF (chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor) via a composite nuclear receptor-regulatory element. *Mol Endocrinol* 12:1010-1022
21. Castro DS, Arvidsson M, Bondesson Bolin M, Perlmann T 1999 Activity of Nurr1 carboxyl-terminal domain depends on cell type and integrity of the activation function 2. *J Biol Chem* 274:37483-37490
22. Milbrandt J 1988 Nerve growth factor induces a gene homologous to the glucocorticoid receptor gene. *Neuron* 1:183-188
23. Watson MA, Milbrandt J 1989 *Mol Cell Biol* 9:4213-4219
24. Hazel TG, Nathans D, Lau LF 1988 A gene inducible by serum growth factors encodes a member of the steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:8444-8448

25. Law SW, Conneely OM, DeMayo FJ, O'Malley BW 1992 Identification of a new brain-specific transcription factor, NURR1. *Mol Endocrinol* 6:2129-2135
26. Ohkura N, Hijikuro M, Yamamoto A, Miki K 1994 Molecular cloning of a novel thyroid/steroid receptor superfamily gene from cultured rat neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 205:1959-1965
27. Hazel TG, Misra R, Davis IJ, Greenberg ME, Lau LF 1991 Nur77 is differentially modified in PC12 cells upon membrane depolarization and growth factor treatment. *Mol Cell Biol* 11:3239-3246
28. Calnan BJ, Szychowski S, Chan FK, Cado D, Winoto A 1995 A role for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis accompanying antigen-induced negative selection. *Immunity* 3:273-282
29. Cheng LEC, Chan FKM, Cado D, Winoto A 1997 Functional redundancy of the Nur77 and Nur-1 orphan steroid receptors in T-cell apoptosis. *EMBO J* 16:1865-1875
30. Philips A, Maira MH, Mullick A, Chamberland M, Lesage S, Hugo P, Drouin J 1997 Antagonism between Nur77 and glucocorticoid receptor for control of transcription. *Mol Cell Biol* 17:5952-5959
31. Maira MH, Martens C, Philips A, Drouin J 1999 Heterodimerization between members of the Nur subfamily of orphan nuclear receptors as a novel mechanism for gene activation. *Mol Cell Biol* 19:7549-7557
32. Liu ZG, Smith SW, McLaughlin KA, Schwartz LM, Osborne BA 1994 Apoptotic signals delivered through the T-cell receptor of a T-cell hybrid require the immediate-early gene nur77. *Nature* 367:281-284
33. Crawford PA, Sadovsky Y, Woodson K, Lee SL, Milbrandt J 1995 Adrenocortical function and regulation of the steroid 21-hydroxylase gene in NGFI-B-deficient mice. *Mol Cell Biol* 15:4331-16
34. Davis IJ, Lau LF 1994 Endocrine and neurogenic regulation of the orphan nuclear receptors Nur77 and Nur-1 in the adrenal glands. *Mol Cell Biol* 14:3469-3483
35. Wilson TE, Mouw AR, Weaver CA, Milbrandt J, Parker KL 1993 The orphan nuclear receptor NGFI-B regulates expression of the gene encoding steroid 21-hydroxylase. *Mol Cell Biol* 13:861-868
36. Honkaniemi J, Kononen J, Kainu T, Pyykonen I, Pelto-Huikko M 1994 Induction of multiple immediate early genes in rat hypothalamic paraventricular nucleus after stress. *Brain Res* 25:234-241

37. Swirnoff AH, Milbrandt J 1995 DNA-binding specificity of NGFI-A and related zinc finger transcription factors. *Mol Cell Biol* 15:2275-2287
38. Horlein AJ, Naar AM, Heinzl T, Torchia J, Gloss B, Kurokawa R, Ryan A, Kamei Y, Soderstrom M, Glass CK, et al 1995 Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 377:397-404
39. Saucedo-Cardenas O, Conneely OM 1996 Comparative distribution of NURR1 and NUR77 nuclear receptors in the mouse central nervous system. *J Mol Neurosci* 7:51-63
40. Murphy EP, Conneely OM 1997 Neuroendocrine regulation of the hypothalamic pituitary adrenal axis by the nurr1/nur77 subfamily of nuclear receptors. *Mol Endocrinol* 11:39-47
41. Wilson TE, Fahrner TJ, Johnston M, Milbrandt J 1991 Identification of the DNA binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast. *Science* 252:1296-1300
42. Philips A, Lesage S, Gingras R, Maira MH, Gauthier Y, Hugo P, Drouin J 1997 Novel dimeric Nur77 signaling mechanisms in endocrine and lymphoid cells. *Mol Cell Biol* 17:5946-5951
43. Paulsen RE, Weaver CA, Fahrner TJ, Milbrandt J 1992 Domains regulating transcriptional activity of the inducible orphan receptor NGFI-B. *J Biol Chem* 267:16491-16496
44. Davis IJ, Hazel TG, Chen RH, Blenis J, Lau LF 1993 Functional domains and phosphorylation of the orphan receptor Nur77. *Mol Endocrinol* 7:953-964
45. Castillo SO, Xiao Q, Kostrouch Z, Dozin B, Nikodem VM 1998 A divergent role of COOH-terminal domains in Nurr1 and Nur77 transactivation. *Gene Expr* 7:1-12
46. Tremblay GB, Tremblay A, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Labrie F, Giguere V 1997 Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor beta. *Mol Endocrinol* 11:353-365
47. Voegel JJ, Heine MJ, Tini M, Vivat V, Chambon P, Gronemeyer H 1998 The coactivator TIF2 contains three nuclear receptor-binding motifs and mediates transactivation through CBP binding-dependent and -independent pathways. *EMBO J* 17:507-519
48. Chrivia JC, Kwok RP, Lamb N, Hagiwara M, Montminy MR, Goodman RH 1993 Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* 365:855-859
49. Maira MH, Martens C, Drouin J. Potentiation of Nur77 (NGFI-B) transcriptional activity by the protein kinase A pathway. Submitted . 2000

50. Crawford PA, Polish JA, Ganpule G, Sadovsky Y 1997 The activation function-2 hexamer of steroidogenic factor-1 is required, but not sufficient for potentiation by SRC-1. *Mol Endocrinol* 11:1626-1635
51. Ito M, Yu RN, Jameson JL 1998 Steroidogenic factor-1 contains a carboxy-terminal transcriptional activation domain that interacts with steroid receptor coactivator-1. *Mol Endocrinol* 12:290-301
52. Hammer GD, Krylova I, Zhang Y, Darimont BD, Simpson K, Weigel NL, Ingraham HA 1999 Phosphorylation of the nuclear receptor SF-1 modulates cofactor recruitment: integration of hormone signaling in reproduction and stress. *Mol Cell* 3:521-526
53. Yazdanbakhsh K, Choi JW, Li Y, Lau LF, Choi Y 1995 Cyclosporin A blocks apoptosis by inhibiting the DNA binding activity of the transcription factor Nur77. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:437-441
54. Rowan BG, Weigel NL, O'Malley BW 2000 Phosphorylation of steroid receptor coactivator-1. Identification of the phosphorylation sites and phosphorylation through the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 275:4475-4483
55. de Mora JF, Brown M 2000 AIB1 is a conduit for kinase-mediated growth factor signaling to the estrogen receptor. *Mol Cell Biol* 20:5041-5047
56. Goodman RH, Smolik S 2000 CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev* 14:1553-1577

4.DISCUSSION

4.1.CONCLUSIONS

La régulation de la synthèse de la POMC par les Gc peut se produire par différents mécanismes. Il est possible que le nGRE joue un rôle important dans la répression de l'activité transcriptionnelle de base de la POMC (Drouin et al., 1993; Reichardt et al., 1998). Toutefois, il semble que le NBRE (Murphy and Conneely, 1997) et plus particulièrement le NurRE (Philips et al., 1997b), soient également des éléments de réponse essentiels pour réprimer l'activité transcriptionnelle de la POMC induite par le CRH, la PKA ou Nur77/NGFI-B. Cette répression est médiée par un antagonisme de l'activité transcriptionnelle de Nur77 par les Gc. Nous avons apporté la preuve que cet antagonisme implique, du moins en partie, la formation d'un complexe protéique contenant NGFI-B et GR. L'interaction entre ces deux récepteurs nucléaires prend place via leurs DBDs respectifs. Tout comme pour l'antagonisme GR/AP-1 (Heck et al., 1994), GR interagit avec NGFI-B sous la forme de monomère (Fig. 2.6). Il sera intéressant de déterminer si les facteurs Nur interagissent avec GR sous la forme de monomère ou si la formation de dimère est requise pour cette interaction. Nous avons démontré que le DBD de Nurr1 est suffisant pour former des dimères (Fig. 3.5 D). Ainsi, des mutations ponctuelles de différents acides aminés du DBD de Nurr1 et/ou NGFI-B pourraient se révéler très informatives quant aux résidus impliqués dans l'homo- ou l'hétérodimérisation des facteurs Nur et au sujet des structures essentielles aux facteurs Nur pour interagir avec GR.

La formation d'un complexe hétérodimérique entre NGFI-B et GR dans des cellules corticotrophes pourrait, en théorie, être observée dans le système lymphoïde puisque les Gc antagonisent l'activité transcriptionnelle de Nur77 induite par le TCR (Philips et al., 1997a; Philips et al., 1997b). Des hétérodimères de Nur77 et RXR (Perlmann and Jansson, 1995) ou COUP-TF (Wu et al., 1997) ont déjà été décrits par d'autres groupes. Toutefois, ce qui est particulier à Nur77, c'est que contrairement aux autres récepteurs nucléaires, le domaine C-terminal ne semble pas jouer un rôle dans l'interaction avec GR. Le DBD est essentiel pour observer la formation du complexe Nur77/GR et le domaine N-terminal du Nur77 semble jouer un rôle auxiliaire dans l'interaction. Mais ces mêmes domaines sont impliqués dans l'interaction de Nur77 avec COUP-TF (Wu et al., 1997). Ainsi, il est permis de croire que Nur77 peut former des complexes peu communs avec les autres récepteurs nucléaires. Bien que GR ait la réputation d'agir seulement sous la forme d'homodimère, la formation d'hétérodimères

entre GR et d'autres récepteurs nucléaires a déjà été rapporté par d'autres groupes (Chen et al., 1997b; Trapp and Holsboer, 1996; Trapp et al., 1994). AR et GR ont des effets divergents et opposés dans les cellules et les tissus animaux. Ceci se manifeste par un antagonisme transcriptionnel entre ces deux récepteurs nucléaires, dû en partie à la formation d'hétérodimères sur des sites communs de liaison à l'ADN (Chen et al., 1997b). Il serait intéressant de déterminer si le complexe Nur77/GR peut se former sur l'ADN. Soit sur le NBRE/nGRE ou sur des éléments de réponse artificiels permettant ainsi la modulation de l'activité de l'un ou de l'autre des récepteurs nucléaires. L'antagonisme transcriptionnel entre GR et NF- κ B n'est pas exclusif à GR puisque NF- κ B antagonise l'activité transcriptionnelle des récepteurs aux oestrogènes, aux androgènes, aux minéralocorticoïdes et de la progestérone (McKay and Cidlowski, 2000) (Liden et al., 1997). Puisque l'antagonisme transcriptionnel GR/NF- κ B implique des mécanismes similaires à celui de GR/Nur77, il est possible de concevoir que Nur77 puisse former des hétérodimères avec d'autres récepteurs nucléaires stéroïdiens.

À priori, nos résultats semblent favoriser la cible dimérique comme étant importante pour l'activité Nur. Premièrement parce que cette cible répond à des stimuli physiologiques comme le traitement de cellules corticotrophes avec du CRH et/ou les Gc, l'activité du NurRE est fortement induite lorsque des hybridômes de cellules T, les cellules DO 11.10, sont stimulées par le TCR alors que le NBRE ne répond pas ou très peu aux mêmes stimuli (Philips et al., 1997a; Philips et al., 1997b). Deuxièmement, parce que les dimères de facteurs Nur recrutent les coactivateurs de la famille p160 et de CBP de façon beaucoup plus efficace que les monomères de facteurs Nur (Fig. 3.1). Un autre groupe a également démontré que SRC-1 n'active pas la transcription de Nur1 sur une cible monomérique (Castro et al., 1999). Ce fait semble être spécifique, du moins jusqu'à présent, aux facteurs Nur puisqu'il a été démontré que l'activité transcriptionnelle de SF-1, qui est un autre récepteur nucléaire orphelin qui lie l'ADN sous forme de monomère, est stimulée par les coactivateurs SRC-1 et CBP (Crawford et al., 1997; Ito et al., 1998; Hammer et al., 1999). Nos résultats suggèrent que les différents membres de la famille SRC-1 stimulent de façon différentielle l'activité transcriptionnelle des facteurs Nur. Alors que SRC-1, SRC-2 et SRC-3 stimule l'activité AF-1 dépendante, SRC-1 semble être le seul à pouvoir potentialiser l'activité AF-2 (fig. 3.4). Récemment deux études ont mis en évidence l'importance de la phosphorylation de SRC-1 par ERK-2 (Rowan et al., 2000) et celle de SRC-3 par les MAPK (de Mora and Brown, 2000) dans la régulation de leur activité de transactivation. Ainsi, les

différences que nous observons entre l'effet des facteurs SRCs sur l'activité AF-2 peuvent être le résultat de la présence ou de l'absence d'une voie de signalisation dans un type cellulaire. Le fait que les facteurs Nur doivent lier l'ADN sous la forme de dimère pour observer un effet des coactivateurs sur leur activité transcriptionnelle est d'autant plus intéressant que PKA stimule de façon spécifique l'activité transcriptionnelle de NGFI-B lorsqu'il lie le NurRE (Maira et al., 2000).

4.2.PERSPECTIVES

Un point important à éclaircir dans les mécanismes impliqués dans la répression de la POMC par les Gc consiste à déterminer l'importance relative du NurRE vs le NBRE/nGRE. Jusqu'à présent nous pouvons imaginer un modèle où les éléments de réponse NurRE et nGRE/NBRE sont tous deux impliqués autant dans l'activation de la transcription de la POMC que dans la répression. Une méthode qui nous permettrait de déterminer l'importance relative du NurRE vs le NBRE/nGRE comme cible pour les Gc dans un système où l'axe HHS serait activé, consisterait à produire des souris transgéniques qui exprimeraient le promoteur POMC avec des mutations ponctuelles au niveau du NurRE et/ou au niveau du NBRE/nGRE. Ce sont des expériences de ce genre avec différentes délétions du promoteur de la POMC qui ont permis à notre groupe de déterminer que la région -480 à +63 du promoteur de la POMC était suffisante pour l'expression tissu-spécifique du transgène et que cette région est suffisante pour observer la répression de l'expression de la POMC par les Gc (Tremblay et al., 1988). En pratiquant l'ablation des surrénales sur ces souris, elles seraient dans un état où l'axe HHS serait dérégulé. Cette expérience nous permettrait premièrement d'observer quelle cible, le NurRE ou le NBRE, est importante pour l'activité Nur, et deuxièmement, en traitant les souris avec ou sans dexaméthasone, il sera possible de déterminer, du moins en théorie, quel élément de réponse est important pour la répression de l'expression de la POMC par les Gc.

Que ce soit au niveau du NurRE ou du NBRE/nGRE, différents mécanismes de répression de l'activité transcriptionnelle de la POMC par les Gc sont possibles. GR peut réprimer la transcription d'un gène par arrimage. Ce mécanisme résulte de la liaison de GR à un facteur de transcription activateur qui est lui-même lié à sa séquence cible sur l'ADN. GR agit comme répresseur en bloquant la fonction activatrice de l'activateur (Drouin, 1993). Ce mécanisme a été proposé pour expliquer la répression du gène de la collagénase par les Gc (Jonat et al., 1990; Lucibello et al., 1990). Une autre hypothèse impliquerait une compétition entre les facteurs Nur et GR pour deux

sites de liaison à l'ADN qui se chevauchent, dans ce cas-ci, le nGRE/NBRE. Un mécanisme de séquestration, c'est-à-dire lorsque deux protéines interagissent entre elles indépendamment de leur liaison à l'ADN (Drouin, 1993), serait également possible. Il serait intéressant de déterminer lequel de ces différents mécanismes est impliqué dans la répression transcriptionnelles de la POMC par les Gc. Un mutant de GR, GR K461A, a été identifié comme un outil très puissant pour distinguer les mécanismes de répression employés par GR dans le contexte de différents promoteurs (Meyer et al., 1997; Starr et al., 1996). Ce mutant transforme l'effet de transrépression dépendant d'une interaction protéine/protéine de GR avec AP-1 ou NF- κ B en une fonction d'activation. Ainsi, dans un cas où la répression de la transcription de la POMC implique un mécanisme d'arrimage, le mutant GR K461A, au lieu de réprimer l'activité transcriptionnelle de Nur77, va stimuler encore plus son activité transcriptionnelle. Par contre, si un mécanisme de compétition pour deux sites de liaison à l'ADN qui se chevauchent (nGRE/NBRE) est impliqué, le mutant K461A se comporte de la même façon que GR sauvage. Jusqu'à présent l'expérience qui a été faite avec ce mutant (Fig.2.7) nous permet seulement de conclure que l'interaction entre NGFI-B et GR est différente de celle de GR/AP-1 et de GR/NF- κ B (Meyer et al., 1997; Starr et al., 1996).

Récemment, un nouveau mécanisme d'action de GR/Gc a été identifié dans la régulation de la transcription du gène codant pour IL-8 et ICAM-1 où GR empêcherait la phosphorylation d'un résidu sérine en position 2 du domaine C-terminal de l'ARN pol II probablement via le recrutement d'un corepresseur qui aurait une activité phosphatase spécifique à la sérine-2 ou une activité inhibitrice de kinase spécifique à la sérine 2 (Nissen and Yamamoto, 2000) (section 1.3.5.6.2.2.). Ainsi, GR pourrait réprimer la transcription de la POMC en interagissant avec Nur77 lié à son élément de réponse et en interférant avec la phosphorylation du domaine C-terminal de l'ARN pol II. Ainsi il serait possible que GR agisse directement au complexe protéine/ADN. Un nouveau mécanisme de répression par les Gc assez séduisant est rapporté dans le cas de la répression de l'activité NF- κ B par les Gc (Ito et al., 2000). Selon cette théorie, GR pourrait réprimer l'activité transcriptionnelle des facteurs Nur par un mécanisme où GR se lierait à NGFI-B lorsqu'il lie le NurRE. Ainsi GR irait inhiber l'activité transcriptionnelle de NGFI-B en bloquant son domaine d'activation, et en inhibant l'activité HAT de CBP (Ito et al., 2000). Il est possible qu'en inhibant l'activité HAT de CBP, GR empêcherait également l'acétylation des facteurs Nur par CBP. De plus, GR pourrait amener des histones déacétylases comme HDAC2 (Ito et al., 2000) au niveau de la matrice d'ADN,

ce qui résulterait en une condensation des interactions ADN/nucléosomes, et réprimerait la transcription de la POMC. Ce mécanisme d'action expliquerait peut-être la disparition graduelle de l'inhibition qu'exerce GR sur l'activité transcriptionnelle de NGFI-B lorsque des quantités croissantes de CBP sont ajoutées dans des expériences de cotransfection (données préliminaires non présentées).

Le rôle que jouent les coactivateurs dans l'antagonisme transcriptionnel entre les facteurs Nur et GR mérite d'être investigué un peu plus dans l'avenir. Bien que de nombreuses études existent sur les mécanismes d'action des coactivateurs sur les RN, et en particulier sur GR, nous commençons à peine à étudier leurs modes d'action sur les membres de la famille Nur. Plusieurs questions demeurent. Ni notre groupe (données non présentées), ni le groupe de T. Perlmann (Castro et al., 1999) n'a pu démontrer une interaction directe entre les facteurs Nur et les coactivateurs de la famille p160. Ceci nous permet de croire que l'effet des coactivateurs sur l'activité transcriptionnelle des facteurs Nur dépend d'une interaction protéine/DNA. C'est-à-dire que les facteurs Nur doivent être liés sur leurs éléments de réponse pour recruter les coactivateurs. Une autre possibilité serait que les coactivateurs exercent leur effet sur une tierce protéine qui elle agit sur les facteurs Nur.

CBP régule l'activité de différents facteurs de transcription en acétylant directement ces facteurs (Pazin and Kadonaga, 1997; Liu et al., 1999; Zhang and Bieker, 1998; Hung et al., 1999; Kouzarides, 2000). Il a été démontré que CBP/p300 acétyle le facteur nucléaire d'hépatocytes 4 (HNF-4, hepatocyte nuclear factor-4) sur deux résidus lysines. Cette acétylation augmente la liaison de HNF-4 à l'ADN (Soutoglou et al., 2000). Le récepteur des androgènes est un autre facteur de transcription qui est acétylé par CBP/p300 *in vitro* et *in vivo*. CBP/p300 acétyle deux résidus lysines retrouvés dans un motif, KXKK, en C-terminal du domaine de liaison à l'ADN de AR. Lorsque ces deux résidus sont mutés, CBP/p300 n'acétyle plus AR, et la réponse transcriptionnelle dépendante du ligand est empêchée (Fu et al., 2000). Deux des trois lysines de AR sont hautement conservées chez les trois membres de la famille Nur (Fig. 1.6). La mutation de ces lysines, l'utilisation de CBP purifié par immunoprécipitation et la mise au point d'essais d'acétylation *in vitro* nous permettraient de déterminer si un mécanisme semblable est impliqué dans la régulation de l'activité Nur stimulée par CBP. En parallèle, des mutations dans le domaine HAT de CBP/p300 pourraient nous indiquer si c'est un mécanisme direct d'acétylation ou si CBP recrute une autre HAT comme pCAF auprès des facteurs Nur. Les facteurs SRC, qui

possèdent également une activité HAT (Westin et al., 2000), pourraient agir de la même façon. En exécutant des expériences de retardement sur gel avec des extraits nucléaires de cellules Cos-1 dans lesquelles Nurr1 est surexprimé avec ou sans SRC-1 nous observons une stabilisation du complexe dimérique sur la sonde NurRE (données préliminaires non présentées) au lieu d'observer un retard de migration similaire à ce qui a été observé pour le récepteur à la vitamine D (VDR, vitamin D receptor) (Takeshita et al., 2000). Ces données semblent appuyer l'hypothèse d'une modification post-traductionnelle de Nurr1 plutôt qu'une interaction directe avec SRC-1. Il nous reste tout de même à déterminer la nature de ces modifications. Toutefois, tout ceci reste de la spéculation et des études plus poussées vont permettre de vérifier ces hypothèses.

Les résultats que nous avons obtenus jusqu'à présent sur la répression de l'expression de la POMC par les Gc nous donnent quelques informations quant aux mécanismes variés qui ont été mis en place pour assurer une réponse au stress adéquate dans le but de maintenir l'homéostasie de l'organisme. Toutefois, de nouvelles options mécanistiques se présentent à nous. Les différentes modifications post-traductionnelles (phosphorylation/acétylation) que les récepteurs nucléaires subissent combinées aux modifications post-traductionnelles qui potentialisent l'activité des coactivateurs, la formation de méga complexes contenant des facteurs de transcription, des coactivateurs, des corépresseurs, offrent la possibilité d'explorer de nouvelles voies mécanistiques inédites. Ainsi, la détermination de ces mécanismes permettra de comprendre les implications associées à la répression des gènes et peut-être de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques.

BIBLIOGRAPHIE

Adler,G.K., Smas,C.M., and Majzoub,J.A. (1988). Expression and dexamethasone regulation of the human corticotropin-releasing hormone gene in a mouse anterior pituitary. *J. Biol. Chem.* 263, 5846-5852.

Aguilera,G., Harwood,J.P., Wilson,J.X., Morell,J., Brown,J.H., and Catt,K.J. (1983). Mechanisms of action of corticotropin-releasing factor and other regulators of corticotropin release in rat pituitary cells. *J. Biol. Chem.* 258, 8039-8045.

Alen,P., Claessens,F., Verhoeven,G., Rombauts,W., and Peeters,B. (1999). The androgen receptor amino-terminal domain plays a key role in p160 coactivator-stimulated gene transcription. *Mol. Cell. Biol.* 19, 6085-6097.

Anzick,S.L., Kononen,J., Walker,R.L., Azorsa,D.O., Tanner,M.M., Guan,X.Y., Sauter,G., Kallioniemi,O.P., Trent,J.M., and Meltzer,P.S. (1997). AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science* 277, 965-968.

Arai,Y., Kubo,T., Kobayashi,K., Takeshita,K., Takahashi,K., Ikeda,T., Imanishi,J., Takigawa,M., and Hirasawa,Y. (1997). Adenovirus vector-mediated gene transduction to chondrocytes: in vitro evaluation of therapeutic efficacy of transforming growth factor-beta 1 and heat shock protein 70 gene transduction. *J. Rheumatol.* 24, 1787-1795.

Ashwell,J.D., Lu,F.W., and Vacchio,M.S. (2000). Glucocorticoids in T cell development and function*. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 309-345.

Aslam,F., Shalhoub,V., van Wijnen,A.J., Banerjee,C., Bortell, R, Shakoori,A.R., Litwack,G., Stein,J.L., Stein,G.S., and Lian,J.B. (1995). Contributions of distal and proximal promoter elements to glucocorticoid regulation of osteocalcin gene transcription. *Mol. Endocrinol.* 9, 679-690.

Auphan,N., DiDonato,J.A., Rosette,C., Helmborg,A., and Karin,M. (1995). Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis [see comments]. *Science* 270, 286-290.

Baxter,J.D., Harris,A.W., Tomkins,G.M., and Cohn,M. (1971). Glucocorticoid receptors in lymphoma cells in culture: relationship to glucocorticoid killing activity. *Science* 171, 189-191.

Beato,M., Herrlich,P., and Schutz,G. (1995). Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell* 83, 851-857.

Berg,J.M. (1989). DNA binding specificity of steroid receptors. *Cell* 57, 1065-1068.

Birnberg,N.C., Lissitzky,J.C., Hinman,M., and Herbert,E. (1983). Glucocorticoids regulate pro-opiomelanocortin gene expression in vivo at the levels of transcription and secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 6982-6986.

Bissonnette,R.P., Brunner,T., Lazarchik,S.B., Yoo,N.J., Boehm,M.F., Green,D.R., and Heyman,R.A. (1995). 9-cis retinoic acid inhibition of activation-induced apoptosis is mediated via regulation of fas ligand and requires retinoic acid receptor and retinoid X receptor activation. *Mol. Cell. Biol.* 15, 5576-5585.

Blagosklonny,M.V. (2000). Cell death beyond apoptosis. *Leukemia* 14, 1502-1508.

Blanchet,S. and Michaille,J.J. (1998). RXR do not represent passive heterodimerization partners. *médecine/sciences* 14, 1211-1216.

Caelles,C., González-Sancho,J.M., and Muñoz,A. (1997). Nuclear hormone receptor antagonism with AP-1 by inhibition of the JNK pathway. *Genes Dev.* 11, 3351-3364.

Caldenhoven,E., Liden,J., Wissink,S., Van de Stolpe,A., Raaijmakers,J., Koenderman,L., Okret,S., Gustafsson,J.A., and van der Saag,P.T. (1995). Negative cross-talk between RelA and the glucocorticoid receptor: a possible mechanism for the antiinflammatory action of glucocorticoids. *Mol. Endocrinol.* 9, 401-412.

Castro,D.S., Arvidsson,M., Bondesson Bolin,M., and Perlmann,T. (1999). Activity of Nurr1 carboxyl-terminal domain depends on cell type and integrity of the activation function 2. *J. Biol. Chem.* 274, 37483-37490.

Chakravarti,D., LaMorte,V.J., Nelson,M.C., Nakajima,T., Schulman,I.G., Juguilon,H., Montminy,M., and Evans,R.M. (1996). Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling. *Nature* 383, 99-103.

Chao,D.M., Gadbois,E.L., Murray,P.J., Anderson,S.F., Sonu,M.S., Parvin,J.D., and Young,R.A. (1996). A mammalian SRB protein associated with an RNA polymerase II holoenzyme. *Nature* 380, 82-85.

Chen,H., Lin,R.J., Schiltz,R.L., Chakravarti,D., Nash,A., Nagy, L, Privalsky,M.L., Nakatani,Y., and Evans,R.M. (1997a). Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell* 90, 569-580.

Chen,J.D. and Evans,R.M. (1995). A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* 377, 454-457.

Chen,S., Wang,J., Yu,G., Liu,W., and Pearce,D. (1997b). Androgen and glucocorticoid receptor heterodimer formation. A possible mechanism for mutual inhibition of transcriptional activity. *J. Biol. Chem.* 272, 14087-14092.

Cheng,L.E.C., Chan,F.K.M., Cado,D., and Winoto,A. (1997). Functional redundancy of the Nur77 and Nor-1 orphan steroid receptors in T-cell apoptosis. *EMBO J.* 16, 1865-1875.

Cohen,J.J. and Duke,R.C. (1984). Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. *J. Immunol.* 132, 38-42.

Cohen,J.J., Duke,R.C., Fadok,V.A., and Sellins,K.S. (1992). Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 10, 267-293.

Crawford,P.A., Polish,J.A., Ganpule,G., and Sadovsky,Y. (1997). The activation function-2 hexamer of steroidogenic factor-1 is required, but not sufficient for potentiation by SRC-1. *Mol. Endocrinol.* 11, 1626-1635.

Crawford,P.A., Sadovsky,Y., Woodson,K., Lee,S.L., and Milbrandt,J. (1995). Adrenocortical function and regulation of the steroid 21-hydroxylase gene in NGFI-B-deficient mice. *Mol. Cell. Biol.* 15, 4331-16.

Davis,I.J., Hazel,T.G., Chen,R.H., Blenis,J., and Lau,L.F. (1993). Functional domains and phosphorylation of the orphan receptor Nur77. *Mol. Endocrinol.* 7, 953-964.

Davis,I.J., Hazel,T.G., and Lau,L.F. (1991). Transcriptional activation by Nur77, a growth factor-inducible member of the steroid hormone receptor superfamily. *Mol. Endocrinol.* 5, 854-859.

Davis,I.J. and Lau,L.F. (1994). Endocrine and neurogenic regulation of the orphan nuclear receptors Nur77 and Nurr-1 in the adrenal glands. *Mol. Cell. Biol.* 14, 3469-3483.

De Bosscher,K., Schmitz,M.L., Vanden Berghe,W., Plaisance,S., Fiers,W., and Haegeman,G. (1997). Glucocorticoid-mediated repression of nuclear factor-kappaB-dependent transcription involves direct interference with transactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13504-13509.

De Bosscher,K., Vanden Berghe,W., Vermeulen,L., Plaisance,S., Boone,E., and Haegeman,G. (2000). Glucocorticoids repress NF-kappaB-driven genes by disturbing the interaction of p65 with the basal transcription machinery, irrespective of coactivator levels in the cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 3919-3924.

de Mora,J.F. and Brown,M. (2000). AIB1 is a conduit for kinase-mediated growth factor signaling to the estrogen receptor. *Mol. Cell. Biol.* 20, 5041-5047.

Drouin,J. (1993). Répression transcriptionnelle : glucocorticoïdes et pro-opiomélanocortine. *médecine/sciences* 9, 509-517.

Drouin,J., Sun,Y.L., Chamberland,M., Gauthier,Y., De Léan,A., Nemer,M., and Schmidt,T.J. (1993). Novel glucocorticoid receptor complex with DNA element of the hormone-repressed POMC gene. *EMBO J.* 12, 145-156.

Drouin,J., Trifiro,M.A., Plante,R.K., Nemer,M., Eriksson,P., and Wrangé,Ö. (1989). Glucocorticoid receptor binding to a specific DNA sequence is required for hormone-dependent repression of pro-opiomelanocortin gene transcription. *Mol. Cell. Biol.* 9, 5305-5314.

Evans,R.M. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240, 889-895.

Fawell,S.E., Lees,J.A., White,R., and Parker,M.G. (1990). Characterization and colocalization of steroid binding and dimerization activities in the mouse estrogen receptor. *Cell* 60, 953-962.

Feng,W., Ribeiro,R.C., Wagner,R.L., Nguyen,H., Apriletti,J.W., Fletterick,R.J., Baxter,J.D., Kushner,P.J., and West,B.L. (1998). Hormone-dependent coactivator binding to a hydrophobic cleft on nuclear receptors. *Science* 280, 1747-1749.

Fernandez,P.M., Brunel,F., Jimenez,M.A., Saez,J.M., Cereghini, S, and Zakin,M.M. (2000). Nuclear receptors Nor1 and NGFI-B/Nur77 play similar, albeit distinct, roles in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Endocrinology* 141, 2392-2400.

Forman,B.M., Ruan,B., Chen,J., Schroepfer,G.J., Jr., and Evans,R.M. (1997). The orphan nuclear receptor LXRalpha is positively and negatively regulated by distinct products of mevalonate metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 10588-10593.

Freedman,L.P. (1999). Increasing the complexity of coactivation in nuclear receptor signaling. *Cell* 97, 5-8.

Fu,M., Wang,C., Reutens,A.T., Wang,J., Angeletti,R.H., Siconolfi-Baez,L., Ogryzko,V., Avantaggiati,M.L., and Pestell,R.G. (2000). p300 and p300/cAMP-response element-binding protein-associated factor acetylate the androgen receptor at sites governing hormone-dependent transactivation. *J. Biol. Chem.* 275, 20853-20860.

Gage,P.J. and Camper,S.A. (1997). Pituitary homeobox 2, a novel member of the *bicoid*-related family of homeobox genes, is a potential regulator of anterior structure formation. *Hum. Mol. Genet.* 6, 457-464.

Grossman,A. (1995). Corticotropin-releasing hormone : basic physiology and clinical applications. In *Endocrinology*, L.J.Degroot, M.Besser, M.Burger, J.L.Jameson, D.L.Loriaux, J.C.Marshall, W.D.Odell, J.T.Jr.Potts, and A.H.Rubenstein, eds. (New York: W.B. Saunders Company), pp. 341-367.

Guardiola-Diaz,H.M., Kolinske,J.S., Gates,L.H., and Seasholtz,A.F. (1996). Negative glucocorticoid regulation of cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate-stimulated corticotropin-releasing hormone-reporter expression in AtT-20 cells. *Mol. Endocrinol.* 10, 317-329.

Halle, J.P. and Meisterernst, M. (1996). Gene expression: increasing evidence for a transcriptosome. *Trends Genet.* 12, 161-163.

Hammer, G.D., Krylova, I., Zhang, Y., Darimont, B.D., Simpson, K., Weigel, N.L., and Ingraham, H.A. (1999). Phosphorylation of the nuclear receptor SF-1 modulates cofactor recruitment: integration of hormone signaling in reproduction and stress. *Mol. Cell* 3, 521-526.

Hazel, T.G., Misra, R., Davis, I.J., Greenberg, M.E., and Lau, L.F. (1991). Nur77 is differentially modified in PC12 cells upon membrane depolarization and growth factor treatment. *Mol. Cell. Biol.* 11, 3239-3246.

Hazel, T.G., Nathans, D., and Lau, L.F. (1988). A gene inducible by serum growth factors encodes a member of the steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 8444-8448.

Heck, S., Bender, K., Kullmann, M., Gottlicher, M., Herrlich, P., and Cato, A.C. (1997). I kappa B alpha-independent downregulation of NF-kappa B activity by glucocorticoid receptor. *EMBO J.* 16, 4698-4707.

Heck, S., Kullmann, M., Gast, A., Ponta, H., Rahmsdorf, H.J., Herrlich, P., and Cato, A.C. (1994). A distinct modulating domain in glucocorticoid receptor monomers in the repression of activity of the transcription factor AP-1. *EMBO J.* 13, 4087-4095.

Heery, D.M., Kalkhoven, E., Hoare, S., and Parker, M.G. (1997). A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* 387, 733-736.

Hengartner, C.J., Thompson, C.M., Zhang, J., Chao, D.M., Liao, S.M., Koleske, A.J., Okamura, S., and Young, R.A. (1995). Association of an activator with an RNA polymerase II holoenzyme. *Genes Dev.* 9, 897-910.

Hirata, Y., Kiuchi, K., Chen, H.C., Milbrandt, J., and Guroff, G. (1993). The phosphorylation and DNA binding of the DNA-binding domain of the orphan nuclear receptor NGFI-B. *J. Biol. Chem.* 268, 24808-24812.

Hirata,Y., Whalin,M., Ginty,D.D., Xing,J., Greenberg,M.E., Milbrandt,J., and Guroff,G. (1995). Induction of a nerve growth factor-sensitive kinase that phosphorylates the DNA-binding domain of the orphan nuclear receptor NGFI-B. *J. Neurochem.* 65, 1780-1788.

Hittelman,A.B., Burakov,D., Iniguez-Lluhi,J.A., and Freedman,L.P. (1999). Differential regulation of glucocorticoid receptor transcriptional activation via AF-1-associated proteins. *EMBO J.* 18, 5380-5388.

Hollenberg,S.M., Giguere,V., Segui,P., and Evans,R.M. (1987). Colocalization of DNA-binding and transcriptional activation functions in the human glucocorticoid receptor. *Cell* 49, 39-46.

Hollenberg,S.M., Weinberger,C., Ong,E.S., Cerelli,G., Oro,A., Lebo,R., Thompson,E.B., Rosenfeld,M.G., and Evans,R.M. (1985). Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* 318, 635-641.

Hong,H., Kohli,K., Garabedian,M.J., and Stallcup,M.R. (1997). GRIP1, a transcriptional coactivator for the AF-2 transactivation domain of steroid, thyroid, retinoid, and vitamin D receptors. *Mol. Cell. Biol.* 17, 2735-2744.

Hong,H., Kohli,K., Trivedi,A., Johnson,D.L., and Stallcup,M.R. (1996). GRIP1, a novel mouse protein that serves as a transcriptional coactivator in yeast for the hormone binding domains of steroid receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 4948-4952.

Honkaniemi,J., Kononen,J., Kainu,T., Pyykonen,I., and Pelto-Huikko,M. (1994). Induction of multiple immediate early genes in rat hypothalamic paraventricular nucleus after stress. *Brain Res.* 25, 234-241.

Honma,K., Honma,S., Nakamura,K., Sasaki,M., Endo,T., and Takahashi,T. (1995). Differential effects of bright light and social cues on reentrainment of human circadian rhythms. *Am. J. Physiol.* 268, R528-R535.

Horlein,A.J., Naar,A.M., Heinzl,T., Torchia,J., Gloss,B., Kurokawa,R., Ryan,A., Kamei,Y., Soderstrom,M., Glass,C.K., and et al (1995). Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 377, 397-404.

Hung,H.L., Lau,J., Kim,A.Y., Weiss,M.J., and Blobel,G.A. (1999). CREB-Binding protein acetylates hematopoietic transcription factor GATA-1 at functionally important sites. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 3496-3505.

Iredale,P.A. and Duman,R.S. (1997). Glucocorticoid regulation of corticotropin-releasing factor1 receptor expression in pituitary-derived AtT-20 cells. *Mol. Pharmacol.* *51*, 794-799.

Ito,K., Barnes,P.J., and Adcock,I.M. (2000). Glucocorticoid receptor recruitment of histone deacetylase 2 inhibits interleukin-1beta-induced histone H4 acetylation on lysines 8 and 12. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 6891-6903.

Ito,M., Yu,R.N., and Jameson,J.L. (1998). Steroidogenic factor-1 contains a carboxy-terminal transcriptional activation domain that interacts with steroid receptor coactivator-1. *Mol. Endocrinol.* *12*, 290-301.

Iwata,M., Hanaoka,S., and Sato,K. (1991). Rescue of thymocytes and T cell hybridomas from glucocorticoid- induced apoptosis by stimulation via the T cell receptor/CD3 complex: a possible in vitro model for positive selection of the T cell repertoire. *Eur. J. Pharmacol.* *21*, 643-648.

Iwata,M., Mukai,M., Nakai,Y., and Iseki,R. (1992). Retinoic acids inhibit activation-induced apoptosis in T cell hybridomas and thymocytes. *J. Immunol.* *149*, 3302-3308.

Janknecht,R. and Hunter,T. (1996b). Transcription. A growing coactivator network. *Nature* *383*, 22-23.

Janknecht,R. and Hunter,T. (1996a). Versatile molecular glue. Transcriptional control. *Curr. Biol.* *6*, 951-954.

Jehn,B.M., Bielke,W., Pear,W.S., and Osborne,B.A. (1999). Cutting edge: protective effects of notch-1 on TCR-induced apoptosis. *J. Immunol.* *162*, 635-638.

Jessop,D.S. (1999). Review: Central non-glucocorticoid inhibitors of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *J. Endocrinol.* *160* , 169-180.

Jonat,C., Rahmsdorf,H.J., Park,K.-K., Cato,A.C.B., Gebel,S., Ponta,H., and Herrlich,P. (1990). Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (fos/jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* 62, 1189-1204.

Kamei,Y., Xu,L., Heinzel,T., Torchia,J., Kurokawa,R., Gloss, B, Lin,S.C., Heyman,R.A., Rose,D.W., Glass,C.K., and Rosenfeld,M.G. (1996). A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* 85, 403-414.

Kang,H.J., Song,M.R., Lee,S.K., Shin,E.C., Choi,Y.H., Kim,S.J., Lee,J.W., and Lee,M.O. (2000). Retinoic acid and its receptors repress the expression and transactivation functions of Nur77: A possible mechanism for the inhibition of apoptosis by retinoic acid. *Exp. Cell Res.* 256, 545-554.

Katagiri,Y., Hirata,Y., Milbrandt,J., and Guroff,G. (1997). Differential regulation of the transcriptional activity of the orphan nuclear receptor NGFI-B by membrane depolarization and nerve growth factor. *J. Biol. Chem.* 272, 31278-31284.

Katagiri,Y., Takeda,K., Yu,Z.X., Ferrans,V.J., Ozato,K., and Guroff,G. (2000). Modulation of retinoid signalling through NGF-induced nuclear export of NGFI-B. *Nat. Cell Biol.* 2, 435-440.

King,D.P. and Takahashi,J.S. (2000). Molecular genetics of circadian rhythms in mammals. *Annual Review of Neuroscience* 23, 713-742.

King,L.B., Vacchio,M.S., and Ashwell,J.D. (1994). To be or not to be: mutually antagonistic death signals regulate thymocyte apoptosis. *Int. Arch. All. Immunol.* 105, 355-358.

King,L.B., Vacchio,M.S., Dixon,K., Hunziker,R., Margulies,D.H., and Ashwell,J.D. (1995). A targeted glucocorticoid receptor antisense transgene increases thymocyte apoptosis and alters thymocyte development. *Immunity* 3, 647-656.

Klug,A. and Schwabe,J.W. (1995). Protein motifs 5. Zinc fingers. *FASEB J.* 9, 597-604.

Koleske,A.J., Buratowski,S., Nonet,M., and Young,R.A. (1992). A novel transcription factor reveals a functional link between the RNA polymerase II CTD and TFIID. *Cell* 69, 883-894.

Koleske,A.J. and Young,R.A. (1994). An RNA polymerase II holoenzyme responsive to activators. *Nature* 368, 466-469.

Koleske,A.J. and Young,R.A. (1995). The RNA polymerase II holoenzyme and its implications for gene regulation. *Trends Biochem. Sci.* 20, 113-116.

Kouzarides,T. (2000). Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *EMBO J.* 19, 1176-1179.

Labrie,F., Veilleux,R., Lefevre,G., Coy,D.H., Sueiras-Diaz,J., and Schally,A.V. (1982). Corticotropin-releasing factor stimulates accumulation of adenosine 3',5'-monophosphate in rat pituitary corticotrophs. *Science* 216, 1007-1008.

Lamolet,B., Pulichino,A.M., Lamonerie,T., Gauthier,Y., and Drouin,J. (2001). A pituitary cell-restricted T-box factor, Tpit, activates POMC transcription in cooperation with Pitx homeoproteins. *Cell* 104, 849-859.

Lamonerie,T., Tremblay,J.J., Lanctôt,C., Therrien,M., Gauthier,Y., and Drouin,J. (1996). PTX1, a *bicoid*-related homeobox transcription factor involved in transcription of pro-opiomelanocortin (POMC) gene. *Genes Dev.* 10, 1284-1295.

Lanctôt,C., Gauthier,Y., and Drouin,J. (1999a). Pituitary homeobox 1 (Ptx1) is differentially expressed during pituitary development. *Endocrinology* 140, 1416-1422.

Lanctôt,C., Lamolet,B., and Drouin,J. (1997). The *bicoid*-related homeoprotein Ptx1 defines the most anterior domain of the embryo and differentiates posterior from anterior lateral mesoderm. *Development* 124, 2807-2817.

Lanctôt,C., Moreau,A., Chamberland,M., Tremblay,M.L., and Drouin,J. (1999b). Hindlimb patterning and mandible development require the *Ptx1* gene. *Development* 126, 1805-1810.

Law,S.W., Conneely,O.M., DeMayo,F.J., and O'Malley,B.W. (1992). Identification of a new brain-specific transcription factor, NURR1. *Mol. Endocrinol.* 6, 2129-2135.

Lee,J.E., Hollenberg,S.M., Snider,L., Turner,D.L., Lipnick,N., and Weintraub,H. (1995a). Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix-loop-helix protein. *Science* 268, 836-844.

Lee,S.L., Wesselschmidt,R.L., Linette,G.P., Kanagawa,O., Russell,J.H., and Milbrandt,J. (1995b). Unimpaired thymic and peripheral T cell death in mice lacking the nuclear receptor NGFI-B (NUR77). *Science* 269 , 532-535.

Lewy,A.J., Sack,R.L., Miller,L.S., and Hoban,T.M. (1987). Antidepressant and circadian phase-shifting effects of light. *Science* 235, 352-354.

Li,H., Gomes,P.J., and Chen,J.D. (1997). RAC3, a steroid/nuclear receptor-associated coactivator that is related to SRC-1 and TIF2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 8479-8484.

Li,H., Kolluri,S.K., Gu,J., Dawson,M.I., Cao,X.H., Hobbs,P.D., Lin,B.Z., Chen,G.Q., Lu,L.S., Lin,F., Xie,Z.H., Fontana,J.A., Reed,J.C., and Zhang,X.k. (2000). Cytochrome c release and apoptosis induced by mitochondrial targeting of nuclear orphan receptor TR3. *Science* 289, 1159-1164.

Li,Y. and Lau,L.F. (1997). Adrenocorticotrophic hormone regulates the activities of the orphan nuclear receptor Nur77 through modulation of phosphorylation. *Endocrinology* 138, 4138-4146.

Liden,J., Delaunay,F., Rafter,I., Gustafsson,J., and Okret,S. (1997). A new function for the C-terminal zinc finger of the glucocorticoid receptor. Repression of RelA transactivation. *J. Biol. Chem.* 272, 21467-21472.

Lippman,M.E., Halterman,R.H., Leventhal,B.G., Perry,S., and Thompson,E.B. (1973). Glucocorticoid-binding proteins in human acute lymphoblastic leukemic blast cells. *J. Clin. Invest.* 52, 1715-1725.

Liu,L., Scolnick,D.M., Trievel,R.C., Zhang,H.B., Marmorstein,R., Halazonetis,T.D., and Berger,S.L. (1999). p53 sites acetylated in vitro by PCAF and p300 are acetylated in vivo in response to DNA damage. *Mol. Cell. Biol.* 19, 1202-1209.

Liu,Z.G., Smith,S.W., McLaughlin,K.A., Schwartz,L.M., and Osborne,B.A. (1994). Apoptotic signals delivered through the T-cell receptor of a T- cell hybrid require the immediate-early gene nur77. *Nature* 367, 281-284.

Lu,H., Zawel,L., Fisher,L., Egly,J.M., and Reinberg,D. (1992). Human general transcription factor IIH phosphorylates the C- terminal domain of RNA polymerase II. *Nature* 358, 641-645.

Lucibello,F.C., Slater,E.P., Jooss,K.U., Beato,M., and Müller,R. (1990). Mutual transrepression of fos and the glucocorticoid receptor: involvement of a functional domain in fos which is absent in fosB. *EMBO J.* 9, 2827-2834.

Maira, M. H., Martens, C., and Drouin, J. Potentiation of Nur77 (NGFI-B) transcriptional activity by the protein kinase A pathway. Submitted . 2000.
Ref Type: Journal (Full)

Maira,M.H., Martens,C., Philips,A., and Drouin,J. (1999). Heterodimerization between members of the Nur subfamily of orphan nuclear receptors as a novel mechanism for gene activation. *Mol. Cell. Biol.* 19, 7549-7557.

Maira,M.H., Philips,A., and Drouin,J. (1998). Signalisation par le récepteur orphelin Nur77 : nouveau mécanisme d'action et antagonisme par les glucocorticoïdes. *médecine/sciences* 14, 1217-1221.

Maldonado,E., Shiekhattar,R., Sheldon,M., Cho,H., Drapkin,R., Rickert,P., Lees,E., Anderson,C.W., Linn,S., and Reinberg,D. (1996). A human RNA polymerase II complex associated with SRB and DNA- repair proteins [published erratum appears in *Nature* 1996 Nov 28; 384(6607):384]. *Nature* 381, 86-89.

Malkoski,S.P. and Dorin,R.I. (1999). Composite glucocorticoid regulation at a functionally defined negative glucocorticoid response element of the human corticotropin-releasing hormone gene. *Mol. Endocrinol.* 13, 1629-1644.

Malkoski,S.P., Handanos,C.M., and Dorin,R.I. (1997). Localization of a negative glucocorticoid response element of the human corticotropin releasing hormone gene. *Mol. Cell. Endocrinol.* 127, 189-199.

Mangelsdorf,D.J., Borgmeyer,U., Heyman,R.A., Zhou,J.Y., Ong,E.S., Oro,A.E., Kakizuka,A., and Evans,R.M. (1992). Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid. *Genes Dev.* 6, 329-344.

Mangelsdorf,D.J. and Evans,R.M. (1995). The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83, 841-850.

Mangelsdorf,D.J., Thummel,C., Beato,M., Herrlich,P., Schutz,G., Umesono,K., Blumberg,B., Kastner,P., Mark,M., Chambon,P., and et al (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83, 835-839.

McInerney,E.M., Rose,D.W., Flynn,S.E., Westin,S., Mullen,T.M., Krones,A., Inostroza,J., Torchia,J., Nolte,R.T., Assa-Munt,N., Milburn,M.V., Glass,C.K., and Rosenfeld,M.G. (1998). Determinants of coactivator LXXLL motif specificity in nuclear receptor transcriptional activation. *Genes Dev.* 12, 3357-3368.

McKay,L.I. and Cidlowski,J.A. (1998). Cross-talk between nuclear factor-kappa B and the steroid hormone receptors: mechanisms of mutual antagonism. *Mol. Endocrinol.* 12, 45-56.

McKay,L.I. and Cidlowski,J.A. (2000). CBP (CREB binding protein) integrates NF-kappa B (nuclear factor-kappa B) and glucocorticoid receptor physical interactions and antagonism. *Mol. Endocrinol.* 14, 1222-1234.

McKenna,N.J., Lanz,R.B., and O'Malley,B.W. (1999a). Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr. Rev.* 20, 321-344.

McKenna,N.J., Xu,J., Nawaz,S.Y., Tsai,S.Y., Tsai,M.J., and O'Malley,B.W. (1999b). Nuclear receptor coactivators: multiple enzymes, multiple complexes, multiple functions. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 69, 3-12.

Meyer,T., Starr,D.B., and Carlstedt-Duke,J. (1997). The rat glucocorticoid receptor mutant K461A differentiates between two different mechanisms of transrepression. *J. Biol. Chem.* 272, 21090-21095.

Murphy,E.P. and Conneely,O.M. (1997). Neuroendocrine regulation of the hypothalamic pituitary adrenal axis by the nurr1/nur77 subfamily of nuclear receptors. *Mol. Endocrinol.* 11, 39-47.

Murphy,E.P., Dobson,A.D., Keller,C., and Conneely,O.M. (1996). Differential regulation of transcription by the NURR1/NUR77 subfamily of nuclear transcription factors. *Gene Expr.* 5, 169-179.

Naya,F.J., Stellrecht,C.M.M., and Tsai,M.J. (1995). Tissue-specific regulation of the insulin gene by a novel basic helix-loop-helix transcription factor. *Genes Dev.* 9, 1009-1019.

Nieman,L. and Cutler Jr,G.B. (1995). Cushing's syndrome. In *Endocrinology*, L.J.Degroot, M.Besser, M.Burger, J.L.Jameson, D.L.Loriaux, J.C.Marshall, W.D.Odell, J.T.Jr.Potts, and A.H.Rubenstein, eds. (New York: W.B. Saunders Company), pp. 1741-1769.

Nissen,R.M. and Yamamoto,K.R. (2000). The glucocorticoid receptor inhibits NFkappaB by interfering with serine-2 phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev.* 14, 2314-2329.

Nolte,R.T., Wisely,G.B., Westin,S., Cobb,J.E., Lambert,M.H., Kurokawa,R., Rosenfeld,M.G., Willson,T.M., Glass,C.K., and Milburn,M.V. (1998). Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature* 395, 137-143.

Nossal,G.J.V. (1994). Negative selection of lymphocytes. *Cell* 76, 229-239.

Ohkura,N., Hijikuro,M., Yamamoto,A., and Miki,K. (1994). Molecular cloning of a novel thyroid/steroid receptor superfamily gene from cultured rat neuronal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205, 1959-1965.

Onate,S.A., Boonyaratanakornkit,V., Spencer,T.E., Tsai,S.Y., Tsai,M.J., Edwards,D.P., and O'Malley,B.W. (1998). The steroid receptor coactivator-1 contains multiple receptor interacting and activation domains that cooperatively enhance the activation function 1 (AF1) and AF2 domains of steroid receptors. *J. Biol. Chem.* 273, 12101-12108.

Onate,S.A., Tsai,S.Y., Tsai,M.J., and O'Malley,B.W. (1995). Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* 270, 1354-1357.

Oppenheim,R.W. (1991). Cell death during development of the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 14, 453-501.

Owens-Grillo,J.K., Hoffmann,K., Hutchison, KA, Yem,A.W., Deibel,M.R., Jr., Handschumacher,R.E., and Pratt,W.B. (1995). The cyclosporin A-binding immunophilin CyP-40 and the FK506-binding immunophilin hsp56 bind to a common site on hsp90 and exist in independent cytosolic heterocomplexes with the untransformed glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* 270, 20479-20484.

Parkes,D., Rivest,S., Lee,S., Rivier,C., and Vale,W. (1993). Corticotropin-releasing factor activates c-fos, NGFI-B, and corticotropin-releasing factor gene expression within the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Mol. Endocrinol.* 7, 1357-1367.

Paulsen,R.E., Weaver,C.A., Fahrner,T.J., and Milbrandt,J. (1992). Domains regulating transcriptional activity of the inducible orphan receptor NGFI-B. *J. Biol. Chem.* 267, 16491-16496.

Pazin,M.J. and Kadonaga,J.T. (1997). Whats up and down with histone deacetylation and transcription. *Cell* 89, 325-328.

Perlmann,T. and Jansson,L. (1995). A novel pathway for vitamin A signaling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and NURR1. *Genes Dev.* 9, 769-782.

Philips,A., Lesage,S., Gingras,R., Maira,M.H., Gauthier,Y., Hugo,P., and Drouin,J. (1997a). Novel dimeric Nur77 signaling mechanisms in endocrine and lymphoid cells. *Mol. Cell. Biol.* 17, 5946-5951.

Philips,A., Maira,M.H., Mullick,A., Chamberland,M., Lesage,S., Hugo,P., and Drouin,J. (1997b). Antagonism between Nur77 and glucocorticoid receptor for control of transcription. *Mol. Cell. Biol.* 17, 5952-5959.

Picard,D. and Yamamoto,K.R. (1987). Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *EMBO J.* 6, 3333-3340.

Pissios,P., Tzameli,I., Kushner,P., and Moore,D.D. (2000). Dynamic stabilization of nuclear receptor ligand binding domains by hormone or corepressor binding. *Mol. Cell* 6, 245-253.

Poulin,G., Lebel,M., Chamberland,M., Paradis,F.W., and Drouin,J. (2000). Specific protein:protein interaction between basic Helix-Loop-Helix transcription factors and homeoproteins of the Pitx family. *Mol. Cell. Biol.* 20, 4826-4837.

Poulin,G., Turgeon,B., and Drouin,J. (1997). NeuroD1/BETA2 contributes to cell-specific transcription of the POMC gene. *Mol. Cell. Biol.* 17, 6673-6682.

Ramdas,J. and Harmon,J.M. (1998). Glucocorticoid-induced apoptosis and regulation of NF-kappaB activity in human leukemic T cells. *Endocrinology* 139, 3813-3821.

Reichardt,H.M., Kaestner,K.H., Tuckermann,J., Kretz,O., Wessely,O., Bock,R., Gass,P., Schmid,W., Herrlich,P., Angel,P., and Schutz,G. (1998). DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell* 93, 531-541.

Reines,D., Conaway,J.W., and Conaway,R.C. (1996). The RNA polymerase II general elongation factors. *Trends Biochem. Sci.* 21, 351-355.

Riegel,A.T., Lu,Y., Remenick,J., Wolford,R.G., Berard,D.S., and Hager,G.L. (1991). Proopiomelanocortin gene promoter elements required for constitutive and glucocorticoid-repressed transcription. *Mol. Endocrinol.* 5, 1973-1982.

Rivier,C. and Shen,G.H. (1994). In the rat, endogenous nitric oxide modulates the response of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis to interleukin-1 beta, vasopressin, and oxytocin. *J. Neurosci.* 14, 1985-1993.

Rowan,B.G., Weigel,N.L., and O'Malley,B.W. (2000). Phosphorylation of steroid receptor coactivator-1. Identification of the phosphorylation sites and phosphorylation through the mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.* 275, 4475-4483.

Rusak,B., McNaughton,L., Robertson,H.A., and Hunt,S.P. (1992). Circadian variation in photic regulation of immediate-early gene mRNAs in rat suprachiasmatic nucleus cells. *Brain Res. Mol Brain Res* 14, 124-130.

Saucedo-Cardenas,O. and Conneely,O.M. (1996). Comparative distribution of NURR1 and NUR77 nuclear receptors in the mouse central nervous system. *J. Mol. Neurosci.* 7, 51-63.

Savory, J.G., Hsu, B., Laquian, I.R., Giffin, W., Reich, T., Hache, R.J., and Lefebvre, Y.A. (1999). Discrimination between NL1- and NL2-mediated nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *Mol. Cell. Biol.* 19, 1025-1037.

Scheinman, R.I., Cogswell, P.C., Lofquist, A.K., and Baldwin, A.S., Jr. (1995b). Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science* 270, 283-286.

Scheinman, R.I., Gualberto, A., Jewell, C.M., Cidlowski, J.A., and Baldwin, A.S., Jr. (1995a). Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF- kappa B by activated glucocorticoid receptors. *Mol. Cell. Biol.* 15, 943-953.

Schmid, W., Cole, T.J., Blendy, J.A., and Schutz, G. (1995). Molecular genetic analysis of glucocorticoid signalling in development. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 53, 33-35.

Schule, R., Rangarajan, P., Kliewer, S., Ransone, L.J., Bolado, J., Yang, N., Verma, I.M., and Evans, R.M. (1990). Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor. *Cell* 62, 1217-1226.

Sheppard, K.A., Phelps, K.M., Williams, A.J., Thanos, D., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G., Gerritsen, M.E., and Collins, T. (1998). Nuclear integration of glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB signaling by CREB-binding protein and steroid receptor coactivator-1. *J. Biol. Chem.* 273, 29291-29294.

Shiau, A.K., Barstad, D., Loria, P.M., Cheng, L., Kushner, P.J., Agard, D.A., and Greene, G.L. (1998). The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell* 95, 927-937.

Smith, C.L., Nawaz, Z., and O'Malley, B.W. (1997). Coactivator and corepressor regulation of the agonist/antagonist activity of the mixed antiestrogen, 4-hydroxytamoxifen. *Mol. Cell. Endocrinol.* 11, 657-666.

Soutoglou, E., Katrakili, N., and Talianidis, I. (2000). Acetylation regulates transcription factor activity at multiple levels. *Mol. Cell* 5, 745-751.

Starr,D.B., Matsui,W., Thomas,J.R., and Yamamoto,K.R. (1996). Intracellular receptors use a common mechanism to interpret signaling information at response elements. *Genes Dev.* 10, 1271-1283.

Steinmetz,E.J. (1997). Pre-mrna processing and the ctd of rna polymerase ii - the tail that wags the dog. *Cell* 89, 491-494: 6.

Subramaniam,N., Cairns,W., and Okret,S. (1997). Studies on the mechanism of glucocorticoid-mediated repression from a negative glucocorticoid response element from the bovine prolactin gene [published erratum appears in *DNA Cell Biol* 1997 May;16(5):670]. *DNA Cell Biol.* 16, 153-163.

Takeshita,A., Ozawa,Y., and Chin,W.W. (2000). Nuclear receptor coactivators facilitate vitamin D receptor homodimer action on direct repeat hormone response elements. *Endocrinology* 141, 1281-1284.

Takeshita,A., Yen,P.M., Misiti,S., Cardona,G.R., Liu,Y., Chin, and WW. (1996). Molecular cloning and properties of a full-length putative thyroid hormone receptor coactivator. *Endocrinology* 137, 3594-3597.

Thomas,N., Edwards,J.L., and Bell,P.A. (1983). Studies of the mechanism of glucocorticoid-induced pyknosis in isolated rat thymocytes. *J. steroid Biochem.* 18, 519-524.

Torchia,J., Rose,D.W., Inostroza,J., Kamei,Y., Westin,S., Glass,C.K., and Rosenfeld,M.G. (1997). The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. *Nature* 387, 677-684.

Trapp,T. and Holsboer,F. (1996). Heterodimerization between mineralocorticoid and glucocorticoid receptors increases the functional diversity of corticosteroid action. [Review] [49 refs]. *Trends Pharmacol. Sci.* 17, 145-149.

Trapp,T., Rupprecht,R., Castren,M., Reul,J.M., and Holsboer,F. (1994). Heterodimerization between mineralocorticoid and glucocorticoid receptor: a new principle of glucocorticoid action in the CNS. *Neuron* 13, 1457-1462.

Tremblay,A., Tremblay,G.B., Labrie,F., and Giguere,V. (1999). Ligand-independent recruitment of SRC-1 to estrogen receptor beta through phosphorylation of activation function AF-1. *Mol. Cell* 3, 513-519.

Tremblay,G.B., Tremblay,A., Copeland,N.G., Gilbert,D.J., Jenkins,N.A., Labrie,F., and Giguere,V. (1997). Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor beta. *Mol. Endocrinol.* 11, 353-365.

Tremblay,Y., Tretjakoff,I., Peterson,A., Antakly,T., Zhang,C.X., and Drouin,J. (1988). Pituitary-specific expression and glucocorticoid regulation of proopiomelanocortin fusion gene in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 8890-8894.

Tuckermann,J.P., Reichardt,H.M., Arribas,R., Richter,K.H., Schutz,G., and Angel,P. (1999). The DNA binding-independent function of the glucocorticoid receptor mediates repression of AP-1-dependent genes in skin. *J. Biol. Chem.* 147, 1365-1370.

Van Cauter,E. and Turek,F.W. (1995). Endocrine and other biological rhythms. In *Endocrinology*, L.J.Degroot, M.Besser, M.Burger, J.L.Jameson, D.L.Loriaux, J.C.Marshall, W.D.Odell, J.T.Jr.Potts, and A.H.Rubenstein, eds. (New York: W.B. Saunders Company), pp. 2487-2548.

Vig,E., Barrett,T.J., and Vedeckis,W.V. (1994). Coordinate regulation of glucocorticoid receptor and c-jun mRNA levels: evidence for cross-talk between two signaling pathways' at the transcriptional level. *Mol. Endocrinol.* 8, 1336-1346.

Voegel,J.J., Heine,M.J., Tini,M., Vivat,V., Chambon,P., and Gronemeyer,H. (1998). The coactivator TIF2 contains three nuclear receptor-binding motifs and mediates transactivation through CBP binding-dependent and -independent pathways. *EMBO J.* 17, 507-519.

Voegel,J.J., Heine,M.J., Zechel,C., Chambon,P., and Gronemeyer,H. (1996). TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *EMBO J.* 15, 3667-3675.

von Boehmer,H. (1994). Positive selection of lymphocytes. *Cell* 76, 219-228.

Vottero,A. and Chrousos,G.P. (1999). Glucocorticoid receptor beta: View I. Trends Endocrinol. Metab. 10, 333-338.

Webb,P., Nguyen,P., Shinsako,J., Anderson,C., Feng,W., Nguyen,M.P., Chen,D., Huang,S.M., Subramanian,S., McKinerney,E., Katzenellenbogen,B.S., Stallcup,M.R., and Kushner,P.J. (1998). Estrogen receptor activation function 1 works by binding p160 coactivator proteins. Mol. Endocrinol. 12, 1605-1618.

Weih,F., Ryseck,R.P., Chen,L., and Bravo,R. (1996). Apoptosis of nur77/N10-transgenic thymocytes involves the Fas/Fas ligand pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 5533-5538.

Westin,S., Rosenfeld,M.G., and Glass,C.K. (2000). Nuclear receptor coactivators. Advances in Pharmacology (New York) 47, 89-112.

Wilson,C.J., Chao,D.M., Imbalzano,A.N., Schnitzler,G.R., Kingston,R.E., and Young,R.A. (1996). RNA polymerase II holoenzyme contains SWI/SNF regulators involved in chromatin remodeling. Cell 84, 235-244.

Wilson,T.E., Fahrner,T.J., Johnston,M., and Milbrandt,J. (1991). Identification of the DNA binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast. Science 252, 1296-1300.

Wilson,T.E., Mouw,A.R., Weaver,C.A., Milbrandt,J., and Parker,K.L. (1993). The orphan nuclear receptor NGFI-B regulates expression of the gene encoding steroid 21-hydroxylase. Mol. Cell. Biol. 13, 861-868.

Wilson,T.E., Paulsen,R.E., Padgett,K.A., and Milbrandt,J. (1992). Participation of non-zinc finger residues in DNA binding by two nuclear orphan receptors. Science 256, 107-110.

Woronicz,J.D., Calnan,B., Ngo,V., and Winoto,A. (1994). Requirement for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis of T-cell hybridomas. Nature 367, 277-281.

Wu,Q., Li,Y., Liu,R., Agadir,A., Lee,M.O., Liu,Y., and Zhang,X. (1997). Modulation of retinoic acid sensitivity in lung cancer cells through dynamic balance of orphan receptors nur77 and COUP-TF and their heterodimerization. EMBO J. 16, 1656-1669.

Wyllie,A.H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284, 555-556.

Xu,L., Glass,C.K., and Rosenfeld,M.G. (1999). Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Curr. Neurobiol.* 9, 140-147.

Yang-Yen,H.F., Chambard,J.C., Sun,Y.L., Smeal,T., Schmidt,T.J., Drouin,J., and Karin,M. (1990). Transcriptional interference between c-jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell* 62, 1205-1215.

Yao,T.P., Ku,G., Zhou,N., Scully,R., and Livingston,D.M. (1996). The nuclear hormone receptor coactivator SRC-1 is a specific target of p300. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 10626-10631.

Zacharchuk,C.M., Mercep,M., Chakraborti,P.K., Simons,S.S., Jr., and Ashwell,J.D. (1990). Programmed T lymphocyte death. Cell activation- and steroid-induced pathways are mutually antagonistic. *J. Immunol.* 145, 4037-4045.

Zetterstrom,R.H., Solomin,L., Jansson,L., Hoffer,B.J., Olson,L., and Perlmann,T. (1997). Dopamine neuron agenesis in Nurr1-deficient mice. *Science* 276, 248-250.

Zetterstrom,R.H., Solomin,L., Mitsiadis,T., Olson,L., and Perlmann,T. (1996). Retinoid X receptor heterodimerization and developmental expression distinguish the orphan nuclear receptors NGFI-B, Nurr1, and Nor1. *Mol. Endocrinol.* 10, 1656-1666.

Zhang,G., Zhang,L., and Duff,G.W. (1997). A negative regulatory region containing a glucocorticosteroid response element (nGRE) in the human interleukin-1beta gene. *DNA Cell Biol.* 16, 145-152.

Zhang,W. and Bieker,J.J. (1998). Acetylation and modulation of erythroid Kruppel-like factor (EKLF) activity by interaction with histone acetyltransferases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 9855-9860.

Zhang,X., Jeyakumar,M., Petukhov,S., and Bagchi,M.K. (1998). A nuclear receptor corepressor modulates transcriptional activity of antagonist-occupied steroid hormone receptor. *Mol. Endocrinol.* 12, 513-524.